

MÁRCIA REGINA PINCERATI

**POLIMORFISMOS DOS GENES *CD28* E *CTLA4*.
FATORES DE SUSCEPTIBILIDADE AO PÊNFIGO
FOLIÁCEO ENDÊMICO?**

CURITIBA

2006

MÁRCIA REGINA PINCERATI

**POLIMORFISMOS DOS GENES *CD28* E *CTLA4*.
FATORES DE SUSCEPTIBILIDADE AO PÊNFIGO
FOLIÁCEO ENDÊMICO?**

Dissertação apresentada à Coordenação do
Curso de Pós Graduação em Genética, Setor
de Ciências Biológicas, como requisito parcial
para obtenção do título de mestre em genética.
Orientadora: Profa. Maria Luiza Petzl-Erler.

**CURITIBA
2006**

AGRADECIMENTOS

À orientadora, Prof^a Maria Luiza Petzl-Erler, minha admiração, pelos ensinamentos, dedicação e exemplo.

Aos meus pais, pelo amor e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Aos amigos de laboratório, pela paciência e ajuda em todos os momentos.

Às amigas Danielle e Liana pela amizade e pelo ombro amigo.

À amiga Karin, pela ajuda e amizade, principalmente na fase de conclusão deste trabalho.

Aos amigos do Departamento de Genética, pelo convívio e torcida.

Aos Professores do Departamento de Genética, por todos ensinamentos.

Às amigas Ana, Andréa e Tânia, pela amizade, companheirismo e pelo convívio maravilhoso de cada dia.

À todos os meus amigos, de perto ou de longe, recentes ou de longa data, por me fazerem essa pessoa feliz que sou.

*“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade,
é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais
preciosa que temos”.*

Albert Einstein (1879-1955)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Doenças Complexas.....	3
2.2 Pênfigo Foliáceo Endêmico.....	4
2.2.1. Histórico.....	5
2.2.2. Etiologia.....	7
2.2.3. Pênfigo: Genética e Ambiente.....	7
2.2.4. Quadro Clínico e Classificação.....	11
2.2.5. Diagnóstico e Tratamento.....	11
2.3. Autoimunidade.....	12
2.3.1. Mecanismos de autoimunidade.....	13
2.3.2. Coestimulação de linfócitos T e autoimunidade.....	14
2.4. Genes Candidatos.....	16
2.4.1. Região cromossômica 2q33: uma região de genes candidatos.....	16
2.4.2. <i>CD28</i>	17
2.4.2.1. Estrutura do gene e molécula.....	17
2.4.2.2. Funções da molécula <i>CD28</i>	17
2.4.2.3. Polimorfismos do gene <i>CD28</i>	18
2.4.3. <i>CTLA4</i>	19
2.4.3.1. Estrutura do gene e molécula.....	19
2.4.3.2. Funções da molécula <i>CTLA-4</i>	20
2.4.3.3. Polimorfismos do gene <i>CTLA4</i>	22
2.4.4 O marcador D2S72.....	25
3. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1. Amostra.....	28
4.2. Metodologia.....	30
4.2.1. Extração de DNA.....	30
4.2.2. Genotipagem do gene <i>CD28</i>	30
4.2.2.1 Genotipagem do SNP -372 (G,A).....	30
4.2.2.2 Genotipagem da posição +17 (T,C).....	32

4.2.3. Genotipagem do gene <i>CTLA4</i>	36
4.2.3.1. Genotipagem das posições -1722 e -1577.....	36
4.2.3.2. Genotipagem da posição +49.....	38
4.2.3.3. Genotipagem do SNP CT60.....	41
4.2.4. Genotipagem dos locos microssatélites CD28 (CAA) _n , CTLA (TA) _n e D2S72.....	42
4.2.5. Análise Estatística.....	46
5. RESULTADOS.....	48
5.1. Análise individual do SNP -372 do gene <i>CD28</i>	48
5.2. Análise individual da posição +17 (C,T) do intron 3 gene <i>CD28</i>	50
5.3. Análise individual do loco microssatélite <i>CD28</i> (CAA) _n	52
5.4. Análise dos haplótipos do gene <i>CD28</i>	56
5.5. Análise individual do SNP -1722 (C,T) do gene <i>CTLA4</i>	60
5.6. Análise individual do SNP -1577 (A,G) do gene <i>CTLA4</i>	60
5.7. Análise individual do SNP +49 (A,G) do gene <i>CTLA4</i>	63
5.8. Análise individual da posição +6320 (A,G) do gene <i>CTLA4</i>	65
5.9. Análise individual do microssatélite <i>CTLA4</i> (TA) _n	67
5.10. Análise individual do microssatélite D2S72 (CA) _n	71
5.11. Análise dos haplótipos do gene <i>CTLA4</i> e do marcador D2S72.....	75
6. DISCUSSÃO.....	78
6.1. Considerações sobre a composição da amostra.....	78
6.2. Considerações sobre a qualidade das genotipagens.....	78
6.3. Considerações sobre a análise estatística.....	79
6.4. Considerações sobre as análises do gene <i>CD28</i>	80
6.5. Considerações sobre as análises individuais das posições -1722, -1577 e +49.....	81
6.6. Considerações sobre a análise individual da posição +6320 do gene <i>CTLA4</i>	82
6.7. Considerações sobre as análises dos locos microssatélites <i>CTLA4</i> (TA) _n e D2S72.....	84
6.8. Considerações gerais.....	85
7. CONCLUSÕES.....	90
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições utilizadas para amplificação da região que contém o intron 3 do gene <i>CD28</i> pela técnica de PCR-ASO.....	34
Tabela 2. Condições utilizadas para amplificação da região que contém o intron 3 do gene <i>CD28</i> pela técnica de PCR-RFLP.....	35
Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho dos fragmentos e cores de marcação por fluorescência para cada microsatélite.....	43
Tabela 4. Condições para a amplificação dos locos microsatélites <i>CD28</i> (CAA) _n , <i>CTLA4</i> (TA) _n e <i>D2S72</i>	44
Tabela 5. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto às frequências alélicas, genótípicas e de portadores das variantes da posição -372 (A,G) do gene <i>CD28</i>	49
Tabela 6. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto às frequências alélicas, genótípicas e de portadores das variantes da posição +17 (C,T) do intron 3 do gene <i>CD28</i>	51
Tabela 7. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto às frequências alélicas do loco microsatélite <i>CD28</i> (CAA) _n	53
Tabela 8. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto às frequências de portadores das variantes alélicas do loco microsatélite <i>CD28</i> (CAA) _n	54
Tabela 9. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto genótipos mais frequentes encontrados para o loco microsatélite <i>CD28</i> (CAA) _n	55
Tabela 10. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto às frequências dos haplótipos do gene <i>CD28</i>	57
Tabela 11. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto às frequências dos haplótipos das posições 17 e do loco microsatélite <i>CD28</i> (CAA) _n do gene <i>CD28</i>	58
Tabela 12. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto às frequências dos haplótipos da posições 17 e -372 do gene <i>CD28</i>	59
Tabela 13. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto às frequências dos haplótipos da posição -372 e loco microsatélite <i>CD28</i> (CAA) _n do gene <i>CD28</i>	59
Tabela 14. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto às frequências alélicas, genótípicas e de portadores das variantes da posição -1722 (T,C) do gene <i>CTLA4</i>	61

Tabela 15. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto às frequências alélicas, genotípicas e de portadores das variantes da posição -1577 (A,G) do gene <i>CTLA4</i>	62
Tabela 16. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto às frequências alélicas, genotípicas e de portadores das variantes da posição +49 (A,G) do gene <i>CTLA4</i>	64
Tabela 17. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto às frequências alélicas, genotípicas e de portadores das variantes da posição +6320 (CT60/A,G) do gene <i>CTLA4</i>	66
Tabela 18. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto às frequências alélicas do loco microssatélite <i>CTLA4</i> (TA)n.....	68
Tabela 19. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto às frequências de portadores das variantes alélicas do loco microssatélite <i>CTLA4</i> (TA)n.....	69
Tabela 20. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto às frequências genotípicas das variantes alélicas do loco microssatélite <i>CTLA4</i> (TA)n.....	70
Tabela 21. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto às frequências alélicas do loco microssatélite D2S72 (CA)n.....	72
Tabela 22. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto às frequências de portadores das variantes alélicas do loco microssatélite D2S72 (CA)n.....	73
Tabela 23. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto às frequências genotípicas do loco microssatélite D2S72 (CA)n.....	74
Tabela 24. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto às frequências dos haplótipos das posições CT60, -1577, -1722, +49 e loco microssatélite <i>CTLA4</i> (TA)n para a amostra euro-brasileira.....	76
Tabela 25. Comparação das amostras de pacientes e controles quanto às frequências dos haplótipos das posições CT60, -1577, -1722, +49 e loco microssatélite <i>CTLA4</i> (TA)n para a amostra afro-brasileira.....	77

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 . Lesões características de pênfigo foliáceo.....	5
Figura 2. Lesões características de pênfigo vulgar.....	5
Figura 3. Modelo para a via imunopatogênica de PFE.....	8
Figura 4. Papel da moléculas co-estimuladoras na ativação de células T.....	16
Figura 5. Representação esquemática da organização interna do gene <i>CD28</i>	17
Figura 6. Região 2q33, mostrando a disposição dos gene <i>CD28</i> , <i>CTLA4</i> e <i>ICOS</i>	25
Figura 7. Região 5'UTR e exon 1 do gene <i>CD28</i>	31
Figura 8. (A) Padrão de bandas obtido após eletroforese para os três genótipos possíveis (G/G, A/G, A/A). (B) Localização da posição variável -372 do gene <i>CD28</i> , no fragmento amplificado por PCR, mostrando o perfil de tamanho de bandas após a clivagem com a enzima de restrição <i>HinfI</i>	32
Figura 9. Localização dos oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação de parte do intron 3 do gene <i>CD28</i>	33
Figura 10. Padrão de bandas encontrados após corrida eletroforética em gel de agarose para genotipagem da posição 17 através da técnica de PCR-ASO.....	33
Figura 11. Localização da posição variável +17 do intron 3 do gene <i>CD28</i> , no fragmento amplificado por PCR, mostrando o perfil de tamanho de bandas após a clivagem com a enzima de restrição <i>AcifI</i>	36
Figura 12. Parte da região promotora do gene <i>CTLA4</i>	37
Figura 13. Representação esquemática do padrão de bandas resultantes da digestão do produto amplificado de parte da região promotora do gene <i>CTLA4</i> com as enzimas de restrição <i>BbvI</i> (A) e <i>MboII</i> (B).....	37
Figura 14. Parte da região 3'UTR do gene <i>CTLA4</i>	41
Figura 15. Gel de agarose corado com brometo de etídeo mostrando o padrão de bandas obtido após a digestão do segmento amplificado com a enzima de restrição <i>HpyCH4IV</i>	45
Figura 16. Parte da região 3'UTR do gene <i>CD28</i>	42
Figura 17. Parte da região 3'UTR do gene <i>CTLA4</i>	43
Figura 18. Região entre os genes <i>CTLA4</i> e <i>ICOS</i> que contém o marcador D2S72.....	43
Figura 19. Padrão de picos encontrados para a genotipagem do loco microssatélite <i>CTLA4</i> (TA) _n . são mostrados indivíduos com genótipo homozigoto 86/86 e heterozigoto 86/92.....	45

Figura 20. Padrão de picos encontrados para a genotipagem do loco microssatélite CD28 (CAA)n. são mostrados indivíduos com genótipos heterozigotos 156/159 (acima) e 159/165.....45

Figura 21. Padrão de picos encontrados para a genotipagem do loco microssatélite D2S72. São mostrados indivíduos com genótipos heterozigotos 163/165 e 165/167.....46

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Afro-brasileiros
<i>CTLA4</i>	Gene que codifica a proteína CTLA-4
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4</i>
<i>CD28</i>	Gene que codifica a proteína CD28
DNAc	DNA complementar
Dsg1	Desmogleína 1
Dsg3	Desmogleína 3
EU	Euro-brasileiros
FS	Fogo selvagem
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
<i>ICOS</i>	Gene que codifica a proteína ICOS
ICOS	<i>Inducible t-cell costimulator</i>
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
pb	Pares de bases
<i>PDCD1</i>	Gene que codifica a proteína PDCD-1
PDCD-1	<i>Programmed cell death 1</i>
PF	Pênfigo foliáceo
PFE	Pênfigo foliáceo endêmico
PPN	Pênfigo paraneoplásico
PV	Pênfigo vulgar
RNA _m	RNA mensageiro
sCTLA-4	Forma solúvel da molécula CTLA-4
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TCR	Receptor de linfócito T

RESUMO

Pênfigo foliáceo endêmico (PFE), também denominado fogo selvagem, é uma doença auto-imune de etiologia complexa. Caracteriza-se clinicamente por bolhas e erosões na pele; histologicamente, por acantólise e formação de bolhas subcórneas e, imunologicamente, pela presença de auto-anticorpos contra a proteína desmossômica desmogleína 1. As características epidemiológicas indicam que fatores ambientais desencadeiam a doença em indivíduos geneticamente susceptíveis e que vários genes contribuem para a etiopatogênese do PFE. Ainda são poucos os genes de susceptibilidade identificados. Os genes *CD28* e *CTLA4*, localizados na região cromossômica 2q33, são considerados candidatos a susceptibilidade a doenças auto-imunes por participarem da regulação da ativação de linfócitos T e no controle de células T autoreativas. O objetivo deste trabalho foi investigar possíveis associações entre variantes dos genes *CD28* e *CTLA4* e do marcador *D2S72*, localizado entre os genes *CTLA4* e *ICOS* e pênfigo foliáceo endêmico. Foram analisados 170 pacientes e 340 indivíduos-controle. Não foram encontradas associações entre variantes alélicas ou genotípicas do gene *CD28* e PFE. Também não foi verificada associação com os haplótipos constituídos pelos sítios polimórficos estudados deste gene. Não foram encontradas associações entre as variantes -1722, -1577 e +49 do gene *CTLA4* e PFE. Em relação ao SNP CT60 (+6320) foi encontrada associação negativa com o estado de portador do alelo A e com o genótipo A/G e associação positiva com o genótipo G/G. Duas hipóteses são propostas para explicar estes resultados: 1) A associação encontrada com o genótipo A/G é causal e este influencia o desenvolvimento da doença. Nesse contexto, a proteção conferida por esta posição variável para certas doenças auto-imunes deve ser diferente dependendo do perfil genético ou dos fatores ambientais que influenciam as doenças genéticas complexas; 2) A associação encontrada é consequência de desequilíbrio de ligação, sendo que este SNP se encontra ligado com o verdadeiro gene de predisposição ao PFE. Este estudo também revelou associações entre variantes dos microssatélites *CTLA4* (TA)_n e *D2S72* e PFE. Foi encontrada associação positiva com o alelo *104 do microssatélite *CTLA4* (TA)_n na amostra euro-brasileira e com o alelo *167 do microssatélite *D2S72* na amostra euro-brasileira e na amostra total. Associação positiva entre PFE e o genótipo 167/167 foi encontrada nos dois subgrupos analisados e na amostra total. As frequências haplotípicas desses dois marcadores em combinação com todas as outras posições analisadas neste trabalho também foram analisadas. Foram encontradas associações positivas entre PFE e os seguintes haplótipos: *D2S72**167_*CTLA4**104 (OR= 1,99); *CT60**G_*D2S72**167 (OR= 1,46) e *CT60**G_*D2S72**167_*CTLA4**104 (OR= 1,99). Diante dos resultados obtidos neste trabalho, sugere-se que as associações encontradas sejam devidas principalmente ao fato de que *CTLA4* não esteja diretamente envolvido no desenvolvimento das doenças auto-imunes e sim, que se encontra ligado ao verdadeiro gene de predisposição a estas doenças. Dessa forma, sugere-se que sejam feitas análises mais detalhadas e envolvendo maior número de marcadores, incluindo posições variáveis de genes próximos a *CTLA4*, para identificação mais precisa dos genes que contribuem para a predisposição a doenças auto-imunes associadas com a região 2q33. Entretanto, o resultado encontrado não exclui o envolvimento das moléculas CD28 e CTLA-4 na patogênese da doença, porém indica que a sua diversidade não exerce impacto sobre a mesma.

1 INTRODUÇÃO

As doenças auto-imunes representam um grupo de distúrbios com diferentes manifestações clínicas, mas com uma característica em comum, resposta imune contra antígenos próprios. A maioria das doenças auto-imunes, individualmente é rara, mas, coletivamente, elas representam um dos principais problemas de saúde pública, afetando cerca de 5 a 7% da população.

O padrão de herança das doenças auto-imunes é complexo, estando fatores endógenos e exógenos envolvidos. Ao contrário dos distúrbios monogênicos, nos quais, o fenótipo geralmente está associado à presença de determinados alelos, em homozigose ou heterozigose, nas doenças de etiologia complexa a presença de um alelo não é condição nem suficiente nem essencial para o estabelecimento do fenótipo.

Genes responsáveis por muitas das doenças de origem monogênica já foram identificados, possibilitando, muitas vezes, o diagnóstico precoce e tratamento. O grande desafio para a genética é a elucidação das causas de doenças conhecidas como complexas, como as doenças auto-imunes, para as quais, muitos genes e fatores ambientais estão envolvidos.

Com relação aos possíveis genes envolvidos, um complexo gênico - MHC (o Complexo Principal de Histocompatibilidade) - está constantemente associado e foi reconhecido como o principal fator de risco genético para doenças auto-imunes. Entretanto, para todas as doenças auto-imunes à predisposição genética conferida por genes do MHC não é suficiente para o desenvolvimento da doença.

Dentre as outras regiões genômicas que possam estar envolvidas na indução da auto-imunidade, está a região 2q33, que abriga os genes *CD28*, *CTLA4* e *ICOS*, os quais codificam moléculas expressas na superfície de células T, participando do processo de ativação e inibição destas células e responsáveis pela manutenção da homeostase imunológica. O equilíbrio dos sinais estimuladores e inibidores fornecidos por essas moléculas é crucial para a tolerância periférica. Falhas dos mecanismos periféricos de autotolerância podem resultar em desenvolvimento de doenças auto-imunes. Portanto, é evidente o potencial que as moléculas codificadas por variantes alélicas destes genes têm de estarem contribuindo para o desencadeamento de doenças auto-imunes.

O Pênfigo foliáceo endêmico (PFE) é uma doença auto-imune caracterizada por bolhas e erosões na pele, provocada por auto-anticorpos com especificidade para moléculas

componentes da epiderme. A etiologia do PFE é desconhecida e, em grande parte, por consequência disto, o tratamento é difícil e com muitos efeitos colaterais. Sem tratamento adequado, o pênfigo pode ser fatal porque grandes áreas da epiderme podem ser perdidas, sendo que a primeira linha de defesa do organismo é comprometida. Isto pode levar à perda de fluidos e infecções secundárias. Desta maneira, é importante elucidar o componente genético envolvido na susceptibilidade a essa doença, uma vez que pode auxiliar tanto na compreensão da patogênese, quanto na identificação de possíveis alvos terapêuticos que proporcionem melhores estratégias de tratamento.

Diante disso, este trabalho destina-se a investigar se polimorfismos de genes que codificam moléculas críticas na modulação da resposta imune – CD28 e CTLA-4 – podem conferir maior ou menor susceptibilidade e/ou resistência ao PFE.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doenças Complexas

As doenças podem ter como causa fatores endógenos (tais como fatores genéticos) e fatores exógenos (tais como fatores ambientais), que geralmente interagem para desencadear a patologia, mas com contribuições diferenciadas. As doenças monogênicas estão entre aquelas onde o papel dos fatores genéticos é predominante e incontestável, uma vez que os padrões genealógicos mendelianos são consistentes (STRACHAN e READ, 2002). Já as doenças infecciosas são decorrentes principalmente de causas ambientais. Entre estes extremos existe um amplo espectro de condições, incluindo doenças oligogênicas e/ou poligênicas com variação na contribuição dos fatores ambientais (PETZL-ERLER, 1999). Como exemplos desta situação pode-se citar as doenças do coração, diabetes, cânceres, esquizofrenia, lúpus eritematoso sistêmico e muitas outras. Todas são exemplos das chamadas doenças “complexas” ou “multifatoriais”, significando que elas não podem ser atribuídas a mutações em um único gene ou a um único fator ambiental.

O tratamento das doenças complexas ainda é bastante difícil, pois suas causas são pouco conhecidas. Por isso, torna-se de grande importância o esclarecimento dos fatores genéticos que contribuem para esse processo. Estes fatores, uma vez identificados, podem auxiliar não só no desenvolvimento de melhores estratégias de tratamento, mas também oferecem uma potencial contribuição para o entendimento da patofisiologia e etiopatogênese da doença, bem como podem prover novos métodos de diagnóstico e prevenção (PETZL-ERLER, 1999).

A contribuição genética para aumentar o risco de desenvolvimento das doenças multifatoriais resulta, na maioria das vezes, de um grande número de variantes polimórficas com baixa penetrância, ou seja, as variantes exercem pequeno efeito no fenótipo (WILLET, 2002).

Para identificar as variantes que conferem um baixo risco relativo são utilizadas as análises de associação caso-controle. Diferentemente das análises de ligação que necessitam de centenas de famílias, as análises de associação requerem amostras de tamanho comparativamente menor (RISCH e MERIKANGAS, 1996). Neste tipo de análise, são comparadas, entre pacientes e indivíduos saudáveis, as frequências alélicas e genotípicas das variantes de genes considerados candidatos a predispor à doença.

Muitas das doenças complexas são atribuídas a disfunções auto-imunes, tais como pênfigo foliáceo e vulgar, artrite reumatóide, diabetes tipo I e lupus. Doenças auto-imunes são condições crônicas que se caracterizam pelo ataque do sistema imune a órgãos e/ou tecidos próprios e afetam aproximadamente 5% da população (BECKER *et al.*, 1998). Os mecanismos envolvidos na auto-imunidade ainda são pouco conhecidos, mas há evidências da participação do componente genético, revelado pela agregação familiar. Isso significa que há um risco maior de um indivíduo consanguíneo apresentar a patologia, quando comparado com o risco de um indivíduo qualquer da população (STRACHAN e READ, 2002).

2.2 Pênfigo Foliáceo Endêmico

O termo pênfigo se refere a um grupo de doenças auto-imunes da pele e membranas mucosas. Elas têm como característica comum a localização de bolhas na camada mais superficial da pele, a epiderme, que confluem e rompem-se facilmente, deixando a pele erodada e formando regiões avermelhadas recobertas por escamas e crostas.

Existem três formas imunopatológicas principais de pênfigo: o pênfigo foliáceo (PF), o pênfigo vulgar (PV) e o pênfigo paraneoplásico (PPN). Em todas estas formas as desmogleínas, glicoproteínas de superfície, sintetizadas pelos queratinócitos que pertencem à família das caderinas e que têm importante função na adesão celular, são alvos dos auto-anticorpos, sendo que a distinção entre elas é dada por qual desmogleína específica é alvo, e se outras proteínas adicionais estão ou não envolvidas. Na pele, as principais desmogleínas (Dsgs) expressas são a Dsg1 e a Dsg3. A Dsg3 está presente na camada suprabasal (inferior) da epiderme e também nas mucosas. No pênfigo vulgar, os auto-anticorpos são direcionados contra a Dsg3. Devido à sua distribuição, as lesões no PV envolvem as membranas mucosas com lesões cutâneas aparecendo secundariamente durante o curso da doença. Já a Dsg1 é restrita à camada subcórnea (superior) do epitélio, sendo a desmogleína alvo dos auto-anticorpos patogênicos no pênfigo foliáceo (PF). Devido à distribuição dessas proteínas na pele, as lesões no PF ocorrem estritamente na camada superficial da epiderme (CHIDGEY, 1997) (Figuras 1 e 2). No pênfigo paraneoplásico, além das desmogleínas, as proteínas plaquinas também são alvo dos auto-anticorpos e à semelhança do PV são encontradas lesões na pele e mucosas (ANHALT, 1999).

O pênfigo foliáceo pode ser reconhecido sob duas formas: o não-endêmico, descrito pela primeira vez em Paris, em 1844, que é raro e ocorre esporadicamente em todo o mundo,

e o endêmico, também conhecido como *fogo selvagem* (FS), que foi registrado pela primeira vez no Brasil, em 1903. Não há diferenças clínicas e histopatológicas entre estas duas formas.



Figura 1. Lesões características do pênfigo foliáceo.



Figura 2. Lesões características do pênfigo vulgar.

2.1.1 Histórico

O FS ocorre de modo endêmico em regiões do território brasileiro. Descrito esporadicamente em vários outros países das Américas, do México à Argentina e na Tunísia, é, entretanto, no Brasil que o FS atinge sua maior incidência. Devido a essa maior ocorrência na América do Sul e, sobretudo no Brasil, durante um certo tempo a doença foi denominada pênfigo foliáceo sul-americano e pênfigo foliáceo brasileiro. A partir do final da década de 1980, a doença passa a ser chamada de pênfigo foliáceo endêmico, designação que reflete

com mais precisão sua principal característica diferencial – a endemidade (CAMPBELL *et al.*, 2001).

A população em risco de adquirir a doença é mais freqüentemente a jovem, de qualquer etnia ou sexo, que viva ou trabalhe em áreas rurais endêmicas do Brasil e, com menor freqüência, em outros países da América Latina (CAMPBELL *et al.*, 2001). Ocorre em regiões com altitude entre 500 a 800 metros, sendo extremamente rara nas regiões abaixo de 400 metros ou acima de 1000 metros (LOMBARDI *et al.*, 1992).

O FS é endêmico em certos estados do Brasil, como, por exemplo, nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná, onde foram mais de 15.000 os casos registrados até 1982.

Historicamente, o primeiro caso documentado de FS no Brasil foi citado por Aranha Campos. Ele descreveu dois casos de FS que apareceram no interior de São Paulo na região de Franca na segunda metade do século 19 (HANS-FILHO *et al.*, 1998).

Com o passar do tempo, houve um aumento significativo do número de casos de FS. Devido a isso e a dramática situação de pacientes que não tinham onde ser hospitalizados, foram construídos hospitais especializados nos estados que apresentavam maior número de pacientes os quais se dedicavam ao estudo e tratamento da doença. O primeiro, Hospital Adhemar de Barros, em São Paulo atendia pacientes que vinham do interior do estado. Mais tarde foram construídos o Hospital do Pênfigo de Goiânia, localizado na cidade de Goiânia no estado de Goiás, e o Hospital Adventista do Pênfigo em Campo Grande no estado do Mato Grosso do Sul. Outros hospitais, em cidades como Uberlândia, também se tornaram especializados no tratamento de pênfigo (LOMBARDI *et al.*, 1992).

A partir da segunda metade da década de 1970, a diminuição dos quantitativos de pacientes nas publicações começa a refletir a diminuição da endemia, que praticamente desaparece em focos importantes, como São Paulo e norte do Paraná, estabilizando-se em patamares bem menos significativos na região Centro-Oeste. Inicia-se a fase de declínio da endemia e estabilização de focos que se estende até hoje. Assim, a história epidemiológica do FS mostra ascensão seguida de queda da endemia, que segue trajetória coincidente com o desbravamento e ocupação de regiões do território brasileiro. Atualmente, parece haver uma estabilização da endemia em áreas restritas, remanescentes dos grandes focos (CAMPBELL *et al.*, 2001).

2.2.2 Etiologia

O FS é uma doença auto-imune órgão-específica de causa desconhecida provocada por auto-anticorpos específicos para a epiderme e responsáveis pelo fenômeno de acantólise. Esse termo implica dissolução, ou lise, das junções intercelulares do epitélio escamoso. As células epiteliais, sem as junções que as mantinham coesas umas às outras, perdem sua forma poliédrica e tornam-se arredondadas. O espaço entre elas resulta na formação de uma bolha intraepidérmica. O soro de pacientes com pênfigo foliáceo contém auto-anticorpos da classe imunoglobulina G (IgG). Podem ser detectados no soro pela técnica da imunofluorescência indireta (IFI), e seus níveis correlacionam-se com a extensão e atividade da doença. Assim, o FS é a única doença auto-imune e, ao mesmo tempo, endêmica.

Os auto-anticorpos do FS, como explicado acima, reagem contra a Dsg1. Indivíduos normais são tolerantes ao antígeno epidérmico, enquanto que nos doentes existe uma perda desta tolerância. Também tem sido demonstrado que pelo menos parte do processo acantolítico não é diretamente resultante de lesão induzida por anticorpos, mas consequência de outro fenômeno. O complexo antígeno-anticorpo induziria a liberação de uma enzima proteolítica (serina-protease) pelos queratinócitos, que poderia agir como ativadora do plasminogênio, levando à produção de plasmina, enzima responsável pela acantólise. Substâncias antigênicas que pudessem funcionar como gatilho inicial do processo continuam sendo motivo de intensa investigação (CAMPBELL *et al.*, 2001).

2.2.3 Pênfigo: fatores genéticos e ambientais

Vários fatores podem estar envolvidos na patogênese da doença, uma vez que nem todos os indivíduos de uma região endêmica desenvolvem a doença, indicando a existência de outros fatores, além do ambiental, no desenvolvimento da doença. O componente genético mostra-se bastante significativo na suscetibilidade à maioria das doenças auto-imunes. No caso de pênfigo, verifica-se isso através da alta frequência de casos da doença em membros geneticamente relacionados entre si.

Com relação aos fatores ambientais, WARREN *et al.* (2000) sugerem que um fator ambiental desencadeador da doença está presente na área endêmica, pois verificaram que os títulos de anticorpos anti-Dsg1 em indivíduos saudáveis elevam-se com o aumento da

proximidade da residência dessas pessoas com a área endêmica de Limão Verde, na qual vivem os indígenas Terena.

Há evidências de que um mosquito, mais especificamente um simulídeo (FAMÍLIA *Simuliidae*), possa atuar como agente transmissor ou desencadeador da resposta auto-imune (LOMBARDI *et al.*, 1992). Recentemente, LI *et al.* (2003) mostraram que um número significativo de pacientes com doenças transmitidas por vetores hematófagos, como oncocercose, leishmaniose e doença de Chagas, possuem auto-anticorpos contra epítomos do quinto domínio extracelular (EC5) da Dsg1 e hipotetizam que um antígeno salivar desses insetos pode conter uma molécula que reage de forma cruzada com a Dsg1 e desencadeia a resposta de anticorpos anti-EC5. De acordo com o modelo proposto, estes pacientes, assim como os pacientes com PFE em estágio pré-clínico, desenvolvem uma resposta inicial de anticorpos não-patogênica contra o EC5 da Dsg1. Esta região, que é muito pequena e próxima à membrana, pode ser críptica, tornando incapaz de sua ligação a anticorpos circulantes anti-EC5. Isto pode explicar porque pacientes com oncocercose, leishmaniose e doença de Chagas não têm pênfigo. Já os pacientes que desenvolvem PF seriam indivíduos geneticamente predispostos, que através do fenômeno de "espalhamento intramolecular de epítomos" produziriam anticorpos patogênicos contra os primeiro (EC1) e segundo (EC2) domínios extracelulares da Dsg1. Os domínios EC1 e EC2 são os responsáveis pela função de adesão das desmogleínas e quando reconhecidos pelos auto-anticorpos podem perder a capacidade de mediar adesão celular e a doença é desencadeada. Este modelo também pode explicar porque muitos indivíduos saudáveis e parentes consanguíneos de pacientes possuem anticorpos anti-Dsg1 e não desenvolvem a doença (Figura 3).

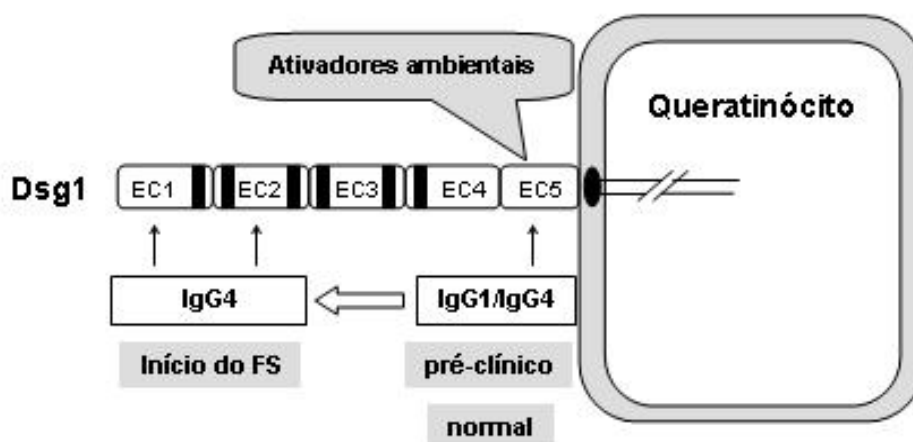


Figura 3. Modelo para a via imunopatogênica de PFE (LI *et al.*, 2003).

Outros agentes em potencial seriam fatores nutricionais. A possibilidade de ingestão de substâncias tóxicas que poderiam estar presentes na água consumida por indivíduos geneticamente predispostos é uma hipótese que carece de dados experimentais e estudos mais aprofundados que a comprovem (CAMPBELL *et al.*, 2001).

Já a participação de um componente genético na patogênese do PFE é evidenciada pela agregação familiar da doença. Poder-se-ia hipotetizar que a agregação é consequência do compartilhamento do mesmo ambiente entre indivíduos da mesma família. No entanto, o número de casos entre indivíduos geneticamente relacionados é muito superior ao de indivíduos com ligações apenas sociais (esposo-esposa, cunhados etc.). Esta desproporcionalidade dos índices indica a existência de uma predisposição genética a esta doença (HANS-FILHO *et al.*, 1999).

Em virtude de sua função na resposta imune e do elevado grau de polimorfismo, os genes situados no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), chamados de genes HLA em humanos, estão entre os mais investigados para associação com doenças auto-imunes, incluindo-se o PF. A associação de moléculas HLA com doenças auto-imunes é devida ao fato de que os aminoácidos polimórficos no sítio de ligação aos peptídeos definem a afinidade da ligação do peptídeo que está sendo apresentado e, portanto, a capacidade de um indivíduo montar uma resposta imune a um antígeno, sendo ele estranho ou próprio (TODD, 1999).

PETZL-ERLER e SANTAMARIA (1989) investigaram, através de tipagem sorológica, uma população caucasóide do sul do Brasil, com objetivo de verificar se genes HLA estavam associados à susceptibilidade ao PFE. Foi constatada associação positiva com HLA DR1 e DR4, e associação negativa com DQ2. Estes resultados foram recentemente confirmados por PAVONI *et al.* (2003), através de tipagem molecular. Outros grupos, trabalhando tanto com o pênfigo foliáceo endêmico (MORAES *et al.*, 1991; MORAES *et al.*, 1997), quanto com a forma esporádica (MIYAGAWA *et al.*, 1999; LOISEAU *et al.*, 2000), encontraram resultados semelhantes. As discordâncias nos resultados das associações são resultantes do polimorfismo HLA entre as populações analisadas, já que associações não detectadas em um certo grupo étnico podem ser explicadas pela ausência ou baixa frequência dos alelos correspondentes nesta população (PAVONI *et al.*, 2003). É isto, por exemplo, que ocorre nas populações ameríndias analisadas (MORAES *et al.*, 1997; CERNA *et al.*, 1993), nas quais um padrão diferente de associações foi registrado.

Apesar das discrepâncias nos resultados das associações, foi verificado que alelos de *HLA-DRB1* positivamente associados com PFE em diferentes grupos étnicos, compartilham

uma sequência de aminoácidos nas posições 67-74, localizada na terceira região hipervariável da molécula: LLEQRRAA (MORAES *et al.*, 1997). Estes dados levaram esses pesquisadores a proporem que esta sequência é que está envolvida na susceptibilidade ao PFE, e não alelos em particular. No trabalho de PAVONI *et al.* (2003) esse motivo também foi positivamente associado com o PFE. Entretanto, alelos que não têm o motivo LLEQRRAA também estão associados com a doença, indicando que outras particularidades das moléculas HLA também são importantes no reconhecimento do antígeno.

Neste trabalho também foi analisada a interação entre os alelos do gene *HLA-DRB1*, demonstrando o efeito de diferentes combinações genótípicas sobre a doença. As interações entre os alelos de susceptibilidade, protetores e neutros desviaram claramente do modelo co-dominante.

Outros estudos buscaram verificar se variantes polimórficas do gene *DSG1*, que codifica o autoantígeno, estão envolvidas nos mecanismos de susceptibilidade ao PFE. MARTEL *et al.* (2002) identificaram variantes polimórficas na posição 809, localizada na região que codifica para o segundo domínio extracelular da Dsg1. Posteriormente, analisaram simultaneamente esse polimorfismo juntamente com genes MHC de classe II na busca de possíveis interações genéticas complexas. Com base nos resultados deste trabalho, os autores sugeriram que a interação entre o alelo DRB*04 e o genótipo C/C de *DSG1* confere uma susceptibilidade maior ao FS. Sendo assim, esses dados demonstram o papel da epistasia entre genes individuais na susceptibilidade ao FS e ilustram mais uma vez a complexidade genética de doenças auto-imunes órgão específicas.

FERREIRA (2003) analisou as posições 809 e 1660 do gene *DSG1* em pacientes com PFE e controles em uma população brasileira. Não foram encontradas associações positivas ou negativas com a doença.

PEREIRA *et al.* (2004) realizaram um estudo de associação entre os polimorfismos das posições -590 do gene *IL4* e -176 do gene *IL6* e PFE. Foi encontrada uma associação positiva com o genótipo T/T de *IL4* -590 (OR= 2,71; $P= 0,00461$) e uma associação negativa com a variante C (OR= 0,37; $P= 0,00446$). Associações com variantes *IL6* -176 sugerem que o genótipo C/C possui um efeito protetor (OR= 0,13; $P= 0,00202$) enquanto que os indivíduos portadores do alelo G possuem maior susceptibilidade ao PFE (OR= 7,66; $P= 0,00190$).

Vários estudos, como os citados acima, mostram associações positivas e negativas entre variantes de genes do MHC e PFE. Porém, essa doença possui caráter poligênico, e pouco se sabe sobre outros genes que possam estar envolvidos em sua patogênese. O estudo de outros genes candidatos, selecionados a partir de sua possível relação com os mecanismos

efetores que desencadeiam o PFE, se fazem necessários na busca de uma melhor compreensão e caracterização da doença.

2.2.4 Quadro Clínico e Classificação

A lesão cutânea primária e mais característica do FS é a bolha superficial, que, na maioria das vezes está rota e transformada em discretas erosões, escama fina e aderente ou em pequena crosta hemorrágica. É bastante comum o líquido da bolha conter bactérias que, com o rompimento e ressecamento, deixam escamas e crostas amareladas.

A doença geralmente se inicia pela cabeça, pescoço e regiões seborréicas, evoluindo em sentido acral. Face e couro cabeludos são locais sempre acometidos no FS.

Clinicamente, o FS evolui dentro de duas grandes formas: localizada e generalizada. Na forma localizada as lesões, em sua maioria, estão limitadas às áreas seborréicas da pele. As lesões são vesículas e pequenas bolhas que rapidamente se rompem, deixando pequenas áreas erosivas. A maioria dos pacientes que apresenta a forma localizada permanece sempre com lesões confinadas nessas áreas. Alguns pacientes portadores dessa forma podem, porém, apresentar disseminação das lesões para o tronco, abdômen e membros superiores e inferiores, evoluindo para a forma generalizada. Esta forma tem sua expressão máxima na fase eritrodérmica, na qual eritema e lesões esfoliativas ocupam todo o tegumento. Os pacientes dessa forma generalizada podem evoluir em sua fase crônica, com lesões do tipo placas verrugosas (CAMPBELL *et al.*, 2001).

2.2.5 Diagnóstico e Tratamento

O FS deve ser diferenciado do pênfigo foliáceo clássico por meio das características epidemiológicas mencionadas. A ausência de lesões orais possibilita a diferenciação entre FS e pênfigo vulgar. O exame histopatológico das lesões da pele permite o diagnóstico de FS. Estudos de imunofluorescência direta das biópsias da pele mostram depósitos de IgG no espaço intercelular. A imunofluorescência indireta revela auto-anticorpos de FS em níveis que se correlacionam com a atividade da doença.

O tratamento do FS faz-se principalmente com corticóides por via oral, sendo que a dose vai sendo reduzida a cada semana a partir da obtenção da melhora clínica. Se houver sinais de infecção bacteriana secundária, utilizam-se antibióticos sistêmicos. Banhos com permanganato de potássio podem ser úteis. Por ser uma moléstia que demanda tratamento

prolongado, há probabilidade de efeitos colaterais, como desenvolvimento de infecções intestinais, efeitos cushingóides, hipertensão, hiperglicemia, aumento de peso, entre outros (CAMPBELL *et al.*, 2001).

2.3 Auto-imunidade

Todos os indivíduos são tolerantes a substâncias próprias potencialmente antigênicas e a falha da autotolerância é a fundamental causa da auto-imunidade.

As doenças auto-imunes representam uma família diversa de doenças com diferentes apresentações clínicas, mas com uma característica comum que envolve uma resposta imune contra um antígeno autólogo. Tem-se estimado que no mínimo 80 doenças humanas têm participação significativa de respostas auto-imunes seja como causa inicial ou contribuindo para a mesma. A maioria das doenças auto-imunes é rara, mas, coletivamente, elas representam um dos principais problemas de saúde pública (ROSE, 2002). Afetam entre 5 a 7% da população mundial. São na sua maioria crônicas e, freqüentemente, comprometem gravemente seus portadores (SINHA *et al.*, 1990). As doenças auto-imunes são uma das principais causas de morbidade e mortalidade do mundo. Muitas dessas doenças tendem a ser de difícil cura devido à razão óbvia do foco da resposta imune ser auto-antígenos e, portanto, não podendo ser eliminados (RIOUX e ABBAS, 2005). As doenças auto-imunes podem afetar um órgão único (ilhas pancreáticas na diabetes do tipo 1 e o sistema nervoso central na esclerose múltipla) ou podem afetar múltiplos órgãos, como é visto no lupus eritematoso sistêmico. Embora a maioria das doenças relacionadas à auto-imunidade ataque desproporcionalmente mulheres, pessoas de ambos os sexos e idades, bem como de diferentes grupos étnicos e sócio-econômicos também são afetados (ROSE, 2002).

Doenças auto-imunes se desenvolvem quando os linfócitos auto-reativos escapam do processo de tolerância e são ativados. Embora os mecanismos pelos quais isso ocorra não estejam inteiramente entendidos, a auto-imunidade é resultado de predisposição genética, podendo ser oligo-ou poligênica, fatores ambientais (como fumo, exposição a patógenos) e eventos estocásticos, o que caracteriza esse grupo de doenças como doenças de etiologia complexa.

Diferentemente das doenças mendelianas simples, nas quais a relação entre a variante genética causal (genótipo) e o estado de doença é determinístico, nas doenças de

características complexas como o que ocorre nas doenças auto-imunes, o estado de doença reconhecido clinicamente é resultado de interações entre múltiplos genes e fatores ambientais.

Embora ainda se tenha um quadro incompleto de como essas relações ocorrem, os avanços na pesquisa com doenças mendelianas simples e complexas estão começando a ajudar na construção de um modelo específico para cada doença, o que levará ao entendimento dos fatores de risco individuais (genéticos e não genéticos), suas interações e impacto na susceptibilidade e progressão da doença (RIOUX e ABBAS, 2005).

2.3.1 Mecanismos de Auto-imunidade

Os mecanismos de autotolerância são estudados detalhadamente em modelos animais e melhor entendidos para as células CD4+.

A autotolerância pode ser dividida em tolerância central e tolerância periférica. Na tolerância central, linfócitos imaturos que reconhecem antígenos próprios nos órgãos linfóides primários (medula óssea para células B e timo para as células T) morrem por apoptose. Essa é a primeira linha de defesa contra a auto-imunidade (RIOUX e ABBAS, 2005). Na tolerância periférica, linfócitos maduros auto-reativos são eliminados ou se tornam não responsivos.

A tolerância central é a principal determinante na discriminação entre o próprio e o não próprio, mas não explica a habilidade do sistema imune em distinguir entre moléculas estranhas e as próprias que estão presentes somente na periferia. Durante a indução da tolerância central são selecionadas aquelas células T, cujos receptores (TCR) interagem com peptídeos associados às moléculas MHC próprias. Sobrevivem à destruição (morte por apoptose) apenas as células T que têm afinidade pelas moléculas MHC (seleção positiva), mas com baixa afinidade por peptídeos presentes nos sulcos destas moléculas que, no ambiente tímico, são peptídeos derivados de proteínas próprias. Sofrem seleção negativa os linfócitos T que têm elevada afinidade pelo complexo peptídeo próprio/MHC.

Algumas células escapam deste processo e passam a integrar o conjunto de células T periféricas, ou porque a afinidade com o auto-antígeno é baixa (e este não está presente em quantidades suficientes), ou porque o antígeno não estava presente durante a ontogenia das células T (ARNOLD *et al.*, 1997).

Após a saída dos linfócitos do timo, existem vários mecanismos periféricos que previnem a ocorrência de auto-imunidade. Entre eles estão a anergia ou ausência de resposta funcional, a deleção (extra-tímica) de células auto-reativas após a interação entre seu receptor

e o complexo MHC-autoantígeno (MILLER *et al.*, 1998) e a supressão por células T reguladoras (WALKER e ABBAS, 2002). A deleção e anergia que ocorrem com células T auto-reativas podem ser devidas à ausência de um sinal co-estimulador, fornecido principalmente pela interação entre a molécula CD28 e seus receptores (CD80 e CD86). Isso ocorre porque na presença de patógenos, as células apresentadoras de antígenos são ativadas e aumentam a expressão das moléculas CD80/CD86 em nível suficiente para fornecer este sinal secundário. Portanto, apenas células apresentadoras de antígenos ativadas podem iniciar respostas de células T (JANEWAY e TRAVERS, 1997).

A existência de múltiplas vias de tolerância, aparentemente obrigatórias, levanta a questão dos motivos dessas serem vias de importância essencial para a autotolerância e não dispensáveis, apesar da aparente redundância funcional. Uma possível explicação é que cada via mantém a tolerância para cada subconjunto de antígenos próprios e a perda de qualquer uma dessas vias resultaria em um conjunto limitado de reações auto-imunes. Uma possibilidade alternativa é que estes múltiplos mecanismos devem atuar em conjunto para manter a autotolerância e a interrupção de qualquer um destes mecanismos pode alterar o balanço entre a tolerância e a auto-imunidade.

ABBAS *et al.* (2004) demonstraram, através de estudos com camundongos transgênicos, que mecanismos diferentes apresentam funções importantes na tolerância de células T para diferentes tipos de auto-antígenos, mostrando a existência de múltiplas vias de tolerância, cada uma associada com interações moleculares específicas, sendo que mecanismos distintos podem ser responsáveis pela tolerância de proteínas secretadas ou teciduais. A tolerância para antígenos tecido-específicos é mantida por dois mecanismos que funcionam cooperativamente: supressão por células T reguladoras e sinalização por moléculas CTLA-4. Já para antígenos sistêmicos, nem CTLA-4, nem células T reguladoras são requeridas para manter a tolerância, indicando a presença de um outro mecanismo para manutenção da tolerância para esse tipo de antígeno.

2.3.2 Co-estimulação de Linfócitos T e Auto-imunidade

Um passo crucial na ativação de células T, durante a resposta imune, é a apresentação do antígeno processado por uma célula apresentadora de antígeno para a célula CD4⁺ no contexto de moléculas MHC. Depois da interação entre o antígeno e o TCR (receptor de célula T), a célula T requer sinais co-estimuladores para expressar a quantidade suficiente de interleucina-2 e assegurar a ocorrência de uma resposta imune celular (TIMOTHY *et al.*,

1996). Enquanto que o primeiro sinal dado à célula (a formação do complexo peptídeo antigênico/MHC) é essencial para iniciar a ativação de células T específicas, o segundo sinal, embora não específico, é crítico para os eventos de ativação que culminam com a proliferação de células T e secreção de citocinas. Na ausência do segundo sinal, as células T tornam-se não responsivas ou anérgicas (JIANFENG *et al.*, 2000) (Figura 4).

As moléculas co-estimuladoras melhor caracterizadas nas células apresentadoras de antígenos são as glicoproteínas CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2). São componentes homodiméricos da superfamília das imunoglobulinas, encontradas exclusivamente na superfície de células capazes de estimular o crescimento das células T através de sua ligação com o receptor CD28 (PAHRAM, 2001).

A molécula CD28 é expressa constitutivamente em linfócitos T. Os sinais transduzidos por CD28 agem sinergisticamente com os sinais derivados do TCR, ativando os linfócitos T. Após a ativação linfocítica, vários mecanismos atuam para que os linfócitos voltem ao estado de repouso. Um deles é a produção de CTLA-4. A expressão de CTLA-4 é induzida apenas após a ativação, alcançando níveis máximos após 48 até 72 horas (LISNLEY *et al.*, 1992). CTLA-4 tem uma afinidade maior por CD80 e CD86 que CD28. Pequena quantidade de CTLA-4 é suficiente para que essas moléculas deixem de se ligar a CD28 e se liguem a CD80 e CD86, fazendo dessa forma a modulação do processo de ativação e inibição de células T (LISNLEY *et al.*, 1991).

Esse modelo de segundo sinal na ativação de linfócitos foi primeiramente proposto por P. Bretscher e M. Cohn e vem sendo cada vez mais investigado por outros pesquisadores para a elucidação dos fatores envolvidos na ativação de células T, de extrema importância na resposta imune (HARLAN *et al.*, 1995).

Pelo fato dos sinais co-estimuladores serem essenciais para o reconhecimento do antígeno pelas células T, uma participação dessa via de co-estimulação no desenvolvimento da auto-imunidade patológica foi hipotetizada, uma vez que a ausência desse estímulo nas células apresentadoras de antígeno em repouso permite a manutenção da tolerância das células T para auto-antígenos. Então, a expressão aberrante das moléculas co-estimuladoras nas células apresentadoras de antígenos pode ativar células T auto-reativas, resultando na auto-imunidade patológica (TIVOL *et al.*, 1996).

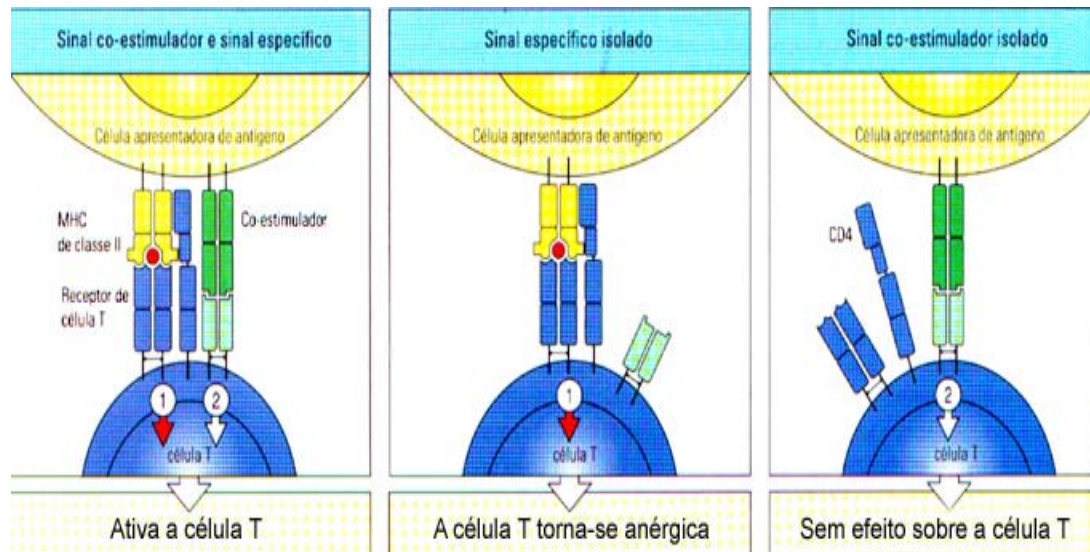


Figura 4. Papel das moléculas co-estimuladoras na ativação de células T (PARHAM, 2001).

2.4 Genes Candidatos

Há vários genes candidatos à participação na patogênese de uma doença auto-imune, por serem polimórficos e codificarem moléculas importantes em uma ou outra etapa do desenvolvimento de uma reação imunológica. Dentre os possíveis, os genes *CD28* e *CTLA4* foram escolhidos para este estudo por apresentarem uma função importante na ativação e inibição de células T na resposta imune e por estarem localizados na região cromossômica 2q33, região na qual se localizam genes associados e/ou ligados a um grande número de doenças auto-imunes.

2.4.1 Região cromossômica 2q33: uma região de genes candidatos

A região cromossômica 2q33 é uma das mais interessantes regiões de genes candidatos não HLA. Abriga genes que codificam dois membros de moléculas co-estimuladoras bem caracterizadas: *CTLA4* (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*) e *CD28*. Nos últimos anos, dois novos genes dessa família têm sido sequenciados: *ICOS* (*Inducible T-cell costimulator*) e *PDCD-1* (*Programmed cell death 1*). Estes genes também codificam moléculas que atuam como reguladores da ativação de células T (HOLOPAINEN *et al.*, 2004).

Os genes *CD28*, *CTLA4* e *ICOS* são contíguos e vários estudos (principalmente de polimorfismos do gene *CTLA4*) demonstraram que esta região está associada com várias doenças auto-imunes, incluindo diabetes tipo I, doença celíaca, esclerose múltipla e doenças auto-imunes da tireóide (HOLOPAINEN *et al.*, 2004). Dessa forma, a região 2q33 é uma excelente candidata para estudos de associação entre polimorfismos genéticos e doenças auto-imunes, como o pênfigo foliáceo.

2.4.2 *CD28*

2.4.2.1 Estrutura do gene e molécula

CD28 é uma glicoproteína membro da superfamília das imunoglobulinas. É expressa como um homodímero unido por pontes de dissulfeto. Cada cadeia polipeptídica tem 44 kDa e inclui um domínio do tipo IgV extracelular único, um domínio transmembrânico e uma cauda citoplasmática (ABBAS *et al.*, 1997).

O gene que codifica esta molécula está localizado no cromossomo 2 (região 2q33). Está presente numa cópia única, organizada em 4 exons, cada qual definindo um domínio estrutural e funcional da proteína (LEE *et al.*, 1990) (Figura 5).

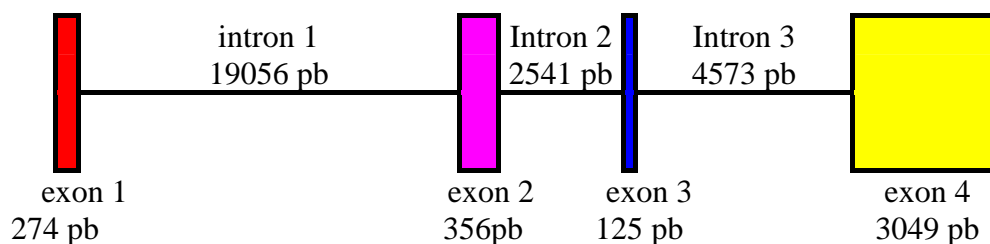


Figura 5. Representação esquemática da organização interna do gene *CD28*, mostrando os exons e introns, com seus respectivos tamanhos.

2.4.2.2 Funções da molécula CD28

CD28 é expressa constitutivamente na maioria das células T e promove a ativação das mesmas. O estímulo dado por CD28, juntamente com o fornecido pelo TCR são responsáveis

por iniciar uma cascata de sinalização que induz a regulação positiva de genes de sobrevivência celular (bcl-xl) (BOISE *et al.*, 1995; SPERLING *et al.*, 1996), aumenta a produção e estabilização de interleucina 2 e RNAs de outras citocinas (FRASER *et al.*, 1991; LINDSTEIN *et al.*, 2000) e facilita a progressão do ciclo celular (BOONEN *et al.*, 1999; APPLEMAN *et al.*, 2000). A molécula CD28 media esses efeitos profundos nas respostas de células T através da sua cauda citoplasmática, a qual contém um motivo YMNМ responsável por iniciar a cascata de sinalização. Dessa forma, CD28 regula o limiar de ativação das células T (BACHMANN *et al.*, 1996) e a ausência do estímulo de CD28, mesmo tendo o estímulo do TCR, pode resultar em um fenótipo de baixa resposta das células T (McADAM *et al.*, 1998).

2.4.2.3 Polimorfismos do gene *CD28*

Este gene apresenta três pontos de variação já analisados para várias doenças auto-imunes, todos encontrados em regiões não codificantes. Na posição 17 do intron 3 ocorrem como variantes alélicas uma timina ou uma citosina. Esse polimorfismo encontra-se perto de um sítio de recomposição (*splicing*) e pode afetar a eficiência do mesmo. Foram realizados estudos de associação com esclerose múltipla na população holandesa (VEEN *et al.*, 2003), diabetes do tipo I na população alemã (WOOD *et al.*, 2002), lupus eritematoso sistêmico na população japonesa (AHMED *et al.*, 2001) e diabetes tipo I também na população japonesa (IHARA *et al.*, 2001). Não foi encontrada associação com nenhuma dessas doenças, exceto na população japonesa para a qual foi encontrada associação com diabetes do tipo I (IHARA *et al.*, 2001).

A repetição trinucleotídica (CAA)_n encontrada na região 3'UTR deste gene foi estudada para hepatite auto-imune e não foi encontrada associação com a doença (DJILALI-SIAH *et al.*, 2001). Em estudo recente, HOLOPAINEN *et al.* (2004) encontraram alelos associados a uma maior proteção à doença celíaca: *CD28*(CAA)*181 e *184.

Recentemente, um novo polimorfismo foi encontrado na posição -372 da região 5'UTR. Foi analisado apenas na população australiana, mas não foi encontrada associação significativa entre esclerose múltipla e essa posição variável. Entretanto, trata-se de uma posição com possível efeito funcional, pois quando a variante A está presente, cria-se um sítio de ligação de uma proteína acentuadora (CCAAT) (TEUSCH *et al.*, 2004).

2.4.3 *CTLA4*

2.4.3.1 Estrutura do gene e molécula

O gene *CTLA4* foi descoberto por BRUNET *et al.* em 1987 em uma biblioteca de DNA complementar de linfócitos T citotóxicos. Posteriormente, constatou-se que a expressão de moléculas por ele codificadas não se restringia aos linfócitos T citotóxicos, pois o RNA mensageiro foi detectado tanto em linfócitos T CD4⁺ quanto CD8⁺ (FREEMAN *et al.*, 1992; LINSLEY *et al.*, 1992).

O gene *CTLA4* na espécie humana foi mapeado na região 2q33 em 1988 (DARIAVACH *et al.*, 1988) e está intimamente ligado ao gene *CD28* (HARPER *et al.*, 1991).

Em humanos, foi originalmente descrito como tendo 3 exons, o primeiro codificando um domínio extracelular homólogo ao variável de imunoglobulinas, com 116 aminoácidos, o segundo codificando a região transmembrânica hidrofóbica com 37 aminoácidos e o terceiro codificando o domínio citoplasmático de 34 aminoácidos (DARIAVACH *et al.*, 1988). Entretanto, as regiões 5' e 3' não traduzidas do DNAc de *CTLA4* humano não foram caracterizadas. Posteriormente, um clone genômico contendo a sequência líder foi identificado e a designação exon/intron foi revisada, com o exon 1 codificando o peptídeo sinal, o exon 2 codificando o domínio de ligação, o exon 3 codificando o domínio transmembrânico e o exon 4 a cauda citoplasmática da proteína (HARPER *et al.*, 1991).

O gene *CTLA4* humano codifica dois transcritos de 1,8 e 0,8 Kb respectivamente, os quais são formados através de sítios de poliadenilação alternativos (HARPER *et al.*, 1991). Foram denominados de isoforma de comprimento total (flCTLA-4) e forma solúvel de CTLA-4 (sCTLA-4). Esta última não apresenta o domínio transmembrânico, codificado pelo exon 3.

A identidade entre a sequência genômica de *CTLA4* entre humanos e camundongos é de 78%, e ao nível de proteína é de 74%, revelando um alto grau de similaridade de sequência entre ambas as regiões codificadoras e não codificadoras (LING *et al.*, 1999). A similaridade entre os genes *CD28* e *CTLA4* e seus produtos em humanos e camundongos sugerem fortemente que *CD28* e *CTLA4* são o resultado de uma duplicação gênica, que deve ter ocorrido antes da divergência entre as espécies, sendo, entretanto suficientemente recente para revelar a homologia entre elas (KRISTIANSEN *et al.*, 2000).

Com relação à expressão celular, algumas diferenças no padrão de expressão entre *CD28* e *CTLA-4* são encontradas. *CD28* é constitutivamente expressa na membrana

plasmática da maioria das células CD4⁺ e em 50% das células CD8⁺. Ao contrário, CTLA-4 não é expressa em células T em repouso, mas é regulada positivamente após ativação e progressão do ciclo celular (LINDSTEN *et al.*, 1993). Enquanto uma quantidade substancial da proteína CTLA-4 é transportada para a superfície celular após ligação do TCR, ela é também rapidamente endocitada via complexo adaptador de claritina (AP-2). Portanto, só uma fração do total de CTLA-4 é expressa na membrana celular em condições normais e, em comparação a CD28, há muito menos CTLA-4 na membrana (CHUANG *et al.*, 1997; SHIRATORI *et al.*, 1997). A função desse complexo padrão de expressão de CTLA-4 não está esclarecida; uma possibilidade é que a restrição de CTLA-4 na superfície permita a CD28 uma interação mais eficiente com seus ligantes, dessa forma, promovendo a ativação de células T. Por outro lado, a habilidade de alterar a expressão de CTLA-4 na sinapse em resposta ao estímulo do TCR providencia um sistema inibitório de sintonia fina (GOUGH *et al.*, 2005).

A interação de CTLA-4 com seus dois ligantes CD80 e CD86 está sendo bastante estudada (SANSOM, 2000). CTLA-4 e CD28 têm diferentes afinidades para seus ligantes, com CTLA-4 tendo aproximadamente 100 vezes mais afinidade dependendo do ligante. Diferenças estruturais entre CD80 e CD86 foram demonstradas. Esses estudos mostram que CD80 existe como um dímero com dois sítios de ligação para CD28/CTLA-4 (IKEMIZU *et al.*, 2000). Em contraste, dados para CD86 indicam que esta não é provavelmente dimérica (COLLINS *et al.*, 2002). Dessa forma, as interações CD80-CTLA-4 são consideravelmente favorecidas. Esse fato ganha suporte com a observação que CD80 seletivamente recruta e estabiliza CTLA-4 na sinapse imune (PENTCHEVA-HOANG T *et al.*, 2004).

Dessa maneira, as afinidades distintas dos ligantes com CD28 e CTLA-4 podem influenciar qual interação (B7-CD28 ou B7-CTLA-4) predominará nos diferentes estágios da resposta imune. Embora seja atraente conceitualmente considerar CTLA-4 como um receptor que gera um sinal negativo através dessas interações, uma variedade de evidências sugere que esta sinalização deve ser somente parte da sua função e o significado dessas observações deve, portanto, ser melhor compreendido (GOUGH *et al.*, 2005).

2.4.3.2 Funções da molécula CTLA-4

CTLA-4 tem um papel imprescindível na homeostase imunológica. Isto pode ser ilustrado quando se observam camundongos *knock-out* para *CTLA4*. Eles desenvolvem uma doença linfoproliferativa maciça, infiltração linfocítica maciça e destruição tecidual que é

letal por volta de 3 a 4 semanas de vida. A maioria dos animais tem níveis aumentados de IgG, o que ilustra o papel de CTLA-4 em respostas tumorais. Essa resposta é presumivelmente direcionada contra múltiplos antígenos próprios (apesar de seleção tímica normal aparente) porque a expressão de um único TCR transgênico impede a doença. Essa função inibidora de CTLA-4 parece ser requerida para se opor a co-estimulação conferida por CD28, porque camundongos *knock-out* para *CD28* e *CTLA4* não sofrem doenças linfoproliferativas (TIVOL *et al.*, 1995; WATERHOUSE *et al.*, 1995).

Vários estudos demonstraram que a adição de fragmentos Fab de anticorpos monoclonais para CTLA-4, *in vitro*, aumenta a proliferação de células T e a produção de citocinas, e a adição destes fragmentos *in vivo* aumenta a resposta para antígenos "nominais", intensificando a citotoxicidade mediada por superantígenos e diminuindo a atividade antitumoral. Em modelos animais de auto-imunidade, como diabetes do tipo I, lupus, artrite reumatóide, a interferência da via CTLA-4:B7 (através de anticorpos monoclonais anti-B7 ou CTLA-4-Ig) afeta a progressão da doença. O tempo de intervenção também é crucial para esse efeito (KRISTIANSEN *et al.*, 2000).

Dessa forma, fica claro que CTLA-4 é um regulador negativo essencial, mas o mecanismo preciso de ação desta molécula ainda não foi totalmente elucidado. Uma possibilidade é que CTLA-4 compete com CD28 para os seus ligantes, impedindo a sinalização por CD28; sendo assim CTLA-4 pode servir como um regulador negativo sem transmitir um sinal negativo propriamente dito (BAROJA *et al.*, 2000). Quando expressos em baixos níveis, os ligantes (CD80 e CD86) podem se ligar preferencialmente com seu receptor de alta afinidade (CTLA-4). Ao contrário, quando esses ligantes são regulados positivamente e tem sua expressão aumentada, devido ao encontro da célula com antígenos imunogênicos ou adjuvantes, as interações predominantes são com CD28, o que leva à proliferação e diferenciação das células T. Como a expressão de CTLA-4 torna-se regulada positivamente após a ativação das células T, a interação inibidora B7-CTLA-4 torna-se agora predominante e a ativação de células T é encerrada (TIVOL *et al.*, 1996).

Outra possibilidade, como descrito no tópico anterior, é a de que CTLA-4 atuaria como regulador negativo gerando sinais inibidores, seja por interromper os sinais positivos do TCR, seja por gerar um sinal negativo (isto é, baseado em fosfatases) (MARTIN *et al.*, 2001). Também foi sugerida uma função na ação de células T reguladoras. Células T reguladoras expressam constitutivamente CTLA-4 e foi visto que a inibição de células T mediada por estas células depende de CTLA-4 (SAKAGUSHI *et al.*, 2004; SHEVACH *et al.*, 2002; MANZOTTI *et al.*, 2002; TANG *et al.*, 2004).

Evidências recentes sugerem maior complexidade. Usando anticorpos anti-CTLA4, foi demonstrado que, juntamente com o bloqueio de CD80 e CD86, CTLA4-Ig pode regular positivamente a enzima IDO. Essa enzima atua na quebra do triptofano (um aminoácido essencial) inibindo assim a ativação de células T. Este mecanismo é sugerido para a variante de recomposição sCTLA-4 (forma solúvel da molécula CTLA-4). Portanto, um possível mecanismo de susceptibilidade a doenças auto-imunes pode ser devido a uma diminuição da produção de sCTLA-4, resultando em uma via de imunossupressão pela enzima IDO menos eficiente (GROHMANN *et al.*, 2002). Essa idéia concorda com as observações de que baixos níveis de sCTLA-4 estão associados com susceptibilidade a doenças auto-imunes (UEDA *et al.*, 2003).

Outro mecanismo pelo qual variações em CTLA-4 poderiam estar envolvidas com o início de doenças vem de estudos que mostram o envolvimento de CTLA-4 com a diferenciação de células T *helper*. Estudos em modelos animais de auto-imunidade, como diabetes do tipo I, demonstram que esta diferenciação é influenciada pelo perfil de citocinas. Devido ao fato da diferenciação de citocinas ser influenciada por condições de estimulação, CD28 e CTLA-4 têm efeitos nesse processo (OOSTERWEGWL *et al.*, 1999). Estudos utilizando camundongos deficientes em CTLA-4 sugerem um desvio em direção ao perfil de células T auxiliares 2 (Th2), indicando que CTLA-4 normalmente se opõe ao fenótipo Th2 (GREENWALD *et al.*, 2001).

Em conjunto, essas observações sugerem que CTLA-4 apresenta uma função crítica na regulação da autotolerância e, conseqüentemente, na susceptibilidade a doenças auto-imunes (KRISTIANSEN *et al.*, 2000).

2.4.3.3 Polimorfismo de gene *CTLA4*

O primeiro polimorfismo identificado no gene *CTLA4* foi a repetição dinucleotídica da região 3' UTR do exon 3. Esse microssatélite (AT)_n começa a 642pb do exon 3 (DARIAVACH *et al.*, 1988). No mínimo, 23 diferentes alelos que variam de 7 a 30 repetições AT, já foram identificados. Foi observada uma associação entre a variante de 17 repetições e a doença de Graves. Foram analisados 133 pacientes caucasóides e 85 controles, obtendo-se *odds ratio* (OR) de 2,82 (YANAGAWA *et al.*, 1995). É interessante que este microssatélite não está presente em camundongos e está localizado em uma região de baixa similaridade entre camundongos e humanos (LING *et al.*, 1999).

O segundo polimorfismo encontrado foi a transição G,A na posição 49 do exon 1. Esse SNP leva a uma troca de aminoácido na posição 17 do peptídeo sinal (A17T). Há um forte desequilíbrio de ligação entre a guanina na posição +49 e o microssatélite de 17 repetições e entre a alanina na posição +49 e a variante de 8 repetições (MARRON *et al.*, 1997). Foi verificada associação entre a variante +49 ou o microssatélite de 17 repetições e diabetes do tipo 1 (NITISCO *et al.*, 1996; MARRON *et al.*, 1997). Vários outros estudos foram realizados com a doença de Graves e tireoidite de Hashimoto, que são doenças auto-imunes da tireóide. Em muitas populações, a variante de 17 repetições do microssatélite e a variante +49G estavam associadas com a doença (DONNER *et al.*, 1997; KOTSA *et al.*, 1997). Outros estudos, caso-controle ou de famílias, foram realizados indicando associação com Doença de Addison (DONNER *et al.*, 1997; KEMP *et al.*, 1998), hipotireoidismo auto-imune (KOTSA *et al.*, 1997; DONNER *et al.*, 1997; NITHIYANANTHAN *et al.*, 2002), doença celíaca (DJILALI-SAIAH *et al.*, 1998), esclerose biliar primária (AGARWAL *et al.*, 2000), lupus eritematoso sistêmico (BARRETO *et al.*, 2004), esclerose múltipla progressiva primária (MAURER *et al.*, 2002) e artrite reumatóide (VAIDYA, *et al.*, 2002; LEE, *et al.*, 2003), em diferentes grupos étnicos.

Parece improvável, entretanto, que este SNP esteja diretamente envolvido na modulação da susceptibilidade a essas doenças, uma vez que a troca de aminoácido não afeta a função do peptídeo sinal, apesar da sugestão desse SNP influenciar o tráfego de CTLA-4 por meio de diferenças no padrão de glicosilação (ANJOS *et al.*, 2002). Dessa forma, a repetição (AT)_n na região 3' não traduzida permanece como melhor candidata para ser o fator de susceptibilidade primária, uma vez que é sabido que seqüências ricas em AT nas regiões 3' não traduzidas podem afetar a estabilidade do RNA, particularmente para genes de resposta imune (CONNE *et al.*, 2000; SHAW *et al.*, 1986).

O terceiro polimorfismo foi identificado por DEICHMANN *et al.* (1996). É uma transição C,T na posição -318 na região promotora do gene. Entretanto, não foi encontrada associação dessa posição variável com doenças auto-imunes. PAVONI *et al.* (2005), estudando ambas as posições +49 e -318 também não encontrou associação com pênfigo foliáceo endêmico.

Novos estudos encontraram novas posições polimórficas no gene *CTLA4*. Destas, foram analisadas em populações as posições -1147, -1577, -1661 e -1722. Apesar de não ter sido encontrada associação entre doenças auto-imunes com variações dessas posições, polimorfismos na região promotora podem acarretar diferenças em níveis transcricionais e

constituem, dessa forma, bons candidatos ao estudo de doenças auto-imunes. A posição -1722 apresentou associação significativa com lupus eritematoso sistêmico na população coreana (HUDSON *et al.*, 2002). Entretanto, quando estudada para a mesma doença na população espanhola, nenhuma associação foi encontrada (AGUILAR *et al.*, 2003).

UEDA *et al.* (2003), analisando 108 SNPs e o marcador (AT)n na região que compreende os genes *CD28*, *CTLA4* e *ICOS*, encontraram associação entre polimorfismos identificados numa região que compreende o gene *CTLA4* e parte do gene *ICOS*. Essa sub-região de aproximadamente 100kb apresenta forte desequilíbrio de ligação. Nesse mesmo estudo, através de análise de regressão, foi visto que cinco SNPs localizados na região 3'UTR do gene *CTLA4* mostram associação mais forte com a doença de Graves. São eles: *CT60*, *MH30*, *JO30*, *JO31* e *JO27_1*. Dentre esses, destaca-se *CT60* (G,A) que se mostrou associado com doença de Graves, hipotireoidismo auto-imune e diabetes tipo I. Interessante foi a verificação que o genótipo G/G está associado com maior susceptibilidade a estas doenças, enquanto que o genótipo A/A está associado à proteção. Usando RT-PCR foi demonstrado que o polimorfismo *CT60* determina a eficiência da recomposição e produção da forma solúvel de CTLA-4: o alelo G acarreta menor produção de forma solúvel de CTLA-4 em comparação ao alelo A. Também foi verificada associação deste SNP com um aumento na frequência de células T reguladoras, sendo que indivíduos homozigotos para o alelo A apresentam um aumento de 30 a 40% na frequência de células T reguladoras. Embora a base do mecanismo pelo qual há ligação entre o SNP *CT60* e o aumento de células T reguladoras ainda não tenha sido estabelecido, essas diferenças encontradas relacionam polimorfismos deste loco e variações das respostas imunes adaptativas para antígenos próprios e patógenos (SOWSAN *et al.*, 2005).

Porém, ANJOS *et al.* (2005) não encontraram diferenças entre transcritos de RNAm de *CTLA4* com relação aos alelos A ou G desta posição, sugerindo que o mecanismo de associação observado entre o SNP *CT60* com doenças auto-imunes ainda precisa ser esclarecido, não envolvendo a modulação de RNAm de qualquer uma das isoformas de CTLA-4.

Devido a sua função e aos vários estudos realizados em diferentes grupos étnicos, alguns grupos sugerem *CTLA4* como um loco para as doenças auto-imunes em geral no que diz respeito às variantes aí encontradas (KRISTIANSEN *et al.*, 2000). Entretanto, não há evidências concretas de que estes polimorfismos alterem a função de CTLA-4, muito menos um mecanismo que explique a associação dessas variantes com as doenças em questão. Dessa forma, levanta-se a hipótese de que as ligações encontradas entre as várias doenças auto-

imunes e a região 2q33 não sejam devidas a *CTLA4*, e sim, a variantes localizadas em genes vizinhos (como *CD28* e *ICOS*) (LING *et al.*, 2001). Somente uma análise detalhada dessa região genômica pode resolver essa questão de forma convincente.

2.4.4 O marcador D2S72

Localizado entre os genes *CTLA4* e *ICOS* (Figura 6), o microssatélite (CA)_n vem sendo objeto de estudo com algumas doenças auto-imunes. Entretanto, até o momento, não foi relatada associação deste com nenhuma das doenças estudadas (AMUNDSEN *et al.*, 2004).

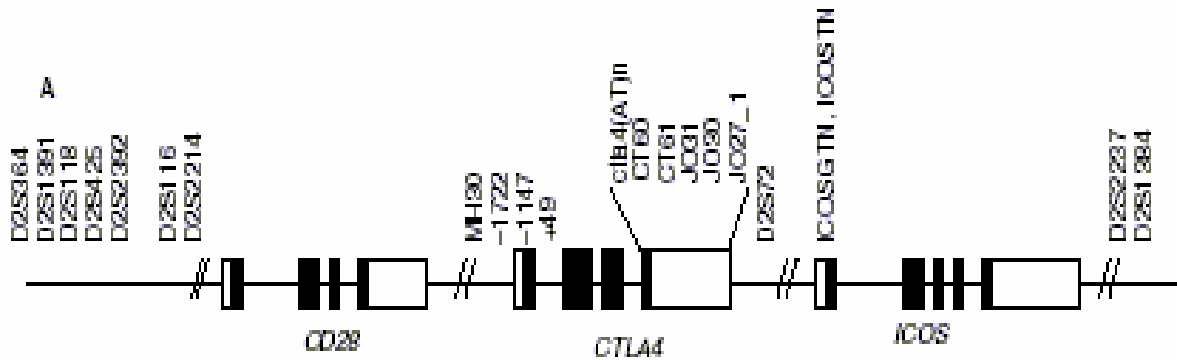


Figura 6. Região 2q33, mostrando a disposição dos genes *CD28*, *CTLA4* e *ICOS*. Em destaque, alguns marcadores encontrados nessa região, incluindo D2S72, CT60, CTLA4 (TA)_n, +49 e -1722. Em preto, as regiões codificadoras dos exons (retângulos) dos três genes. Os retângulos brancos mostram as regiões 3' UTR de cada gene (AMUNDSEN *et al.*, 2004).

3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Apesar da grande diversidade, as diversas doenças auto-imunes apresentam certas características em comum. No topo dessa lista está a predisposição genética, para a qual há evidências para todas as doenças examinadas. O padrão de herança é complexo, indicando que vários genes estão envolvidos. Embora seja improvável que os mesmos genes sejam responsáveis pela predisposição para todas as doenças auto-imunes, um complexo gênico - MHC - está constantemente envolvido e foi reconhecido como o principal fator de risco genético. Entretanto, para todas as doenças auto-imunes à predisposição genética conferida por genes do MHC não é nem suficiente, nem necessária para o desenvolvimento da doença.

Pouco conhecimento foi obtido para outras regiões genômicas que pudessem estar envolvidas na indução da auto-imunidade. Estudos recentes evidenciaram que mecanismos de tolerância periférica de células T são essenciais para o controle de células auto-reativas e falhas dos mecanismos periféricos de autotolerância pode resultar em desenvolvimento de doenças auto-imunes. Portanto, variantes genéticas de moléculas envolvidas nesses mecanismos são excelentes candidatas para conferir diferenças interindividuais de risco para auto-imunidade.

Sendo assim, é possível que variantes alélicas dos genes *CD28* e *CTLA4* possam estar contribuindo para uma diferença quali- ou quantitativa das moléculas por eles codificadas, seja por alteração nas taxas de transcrição e/ou tradução, seja por alteração estrutural/funcional dos seus produtos. Devido à função de seus produtos, variantes desses genes podem estar associadas com maior ou menor predisposição a doenças auto-imunes, como o pênfigo foliáceo endêmico.

O PF endêmico é uma doença de causa desconhecida e, atualmente, sem cura. O tratamento é apenas paliativo e se baseia em imunossupressão generalizada, que traz muitos efeitos colaterais aos pacientes. A identificação dos fatores individuais que causam essa doença contribuirá para que sua patogênese seja melhor compreendida. Esse conhecimento possibilitará a elaboração de estratégias de tratamento e prevenção, minimizando os efeitos colaterais.

Diante do exposto acima, este trabalho tem como objetivo geral verificar se os polimorfismos dos genes *CD28*, *CTLA4* e do marcador molecular D2S72, localizados na região cromossômica 2q33, estão associados com o pênfigo foliáceo endêmico, a fim de

contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos no desencadeamento da doença e para uma melhor compreensão do papel das moléculas codificadas por esses genes.

Os objetivos específicos deste estudo são:

- Comparação das frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas de amostras populacionais de pacientes e indivíduos-controle para as posições -372, 17 (intron 3) e 3'ÚTR do gene *CD28*, assim como, das posições -1772, -1557, +6320 (CT60) e do microsatélite (AT)_n do gene *CTLA4* e do marcador microsatélite intergênico D2S72 (CA)_n.
- Caracterização das frequências das variantes em estudo na população investigada neste trabalho (brasileira, de origem predominantemente européia).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostra

A amostra de pacientes é composta por 170 indivíduos. As amostras de sangue desses pacientes foram coletadas em pequeno número (aproximadamente 20) no Hospital de Dermatologia Sanitária São Roque de Piraquara (Piraquara,PR), em 1987 e as demais foram coletadas no Hospital Adventista do Pênfigo (Campo Grande,MS), entre 1988 e 2004.

A amostra de indivíduos-controle é composta por 340 indivíduos. Esses indivíduos foram contatados em diferentes locais: Santa Casa de Misericórdia de Curitiba (Curitiba, PR) com amostras de sangue coletadas em 1997 e 1998; Hospital Adventista do Pênfigo (Campo Grande, MS), sendo as amostras coletadas entre 1997 e 2004; Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Curitiba, PR) e Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (Curitiba, PR), sendo as amostras coletadas entre 1987 e 2002. Essas amostras foram obtidas dos familiares e/ou amigos dos pacientes, que os acompanhavam no momento da coleta e de funcionários do hospital que voluntariamente se candidatavam para participar do estudo.

Os indivíduos-controle analisados neste estudo são indivíduos sadios e que em sua maioria (58,3%) residem nas áreas endêmicas da doença, sendo originários principalmente de Mato Grosso do Sul (75%), além dos estados do Paraná (20,2%), de Rondônia (1,4%), de Mato Grosso (1,4%), de São Paulo (1,0%), de Minas Gerais (0,5%) e de Santa Catarina (0,5%). O outro grupo controle (41,7%) é constituído por indivíduos provenientes da região metropolitana de Curitiba.

A maioria dos pacientes reside no estado de Mato Grosso do Sul (78,3%), mas 3,6% vivem no Mato Grosso, 3,6% no Paraná, 3,0% em Minas Gerais, 2,5% no Paraguai, 1,0% em Rondônia, 1% no Espírito Santo, 1% em Goiás, 1% em São Paulo, 0,5% no Acre, 0,5% no Amazonas, 0,5% na Argentina, 0,5% na Bolívia, 0,5% no Distrito Federal. Esta informação não foi obtida de 2,5% dos pacientes. Todos estes indivíduos foram diagnosticados para pênfigo foliáceo através dos resultados de exames clínico e histopatológico.

Os indivíduos também foram classificados quanto à escolaridade em analfabetos, semi-analfabetos (escreve o nome), fundamental incompleto, fundamental completo, médio incompleto, médio completo, superior incompleto e superior completo. Entre os pacientes e controles, 73,7% e 40,6%, respectivamente, eram analfabetos, semi-analfabetos ou não

concluíram o ensino fundamental, demonstrando a baixa escolaridade, principalmente entre os pacientes.

A proporção sexual entre os pacientes foi 45,6% de mulheres e 48% homens; entre os controles, havia 53,5% mulheres e 46,5% homens.

A idade média dos pacientes por ocasião da averiguação foi de 42,6, variando de 6 anos a 88 anos, e a dos controles foi de 47,2 variando de 12 anos a 86 anos.

Entre os pacientes, 25,4%, relataram ter um ou mais familiares geneticamente relacionados com a mesma doença, entretanto, familiares de paciente geneticamente relacionados não entraram na amostra.

Com respeito à idade da manifestação da doença, 26,4% dos pacientes apresentaram sintomas clínicos entre dois e vinte anos de idade, 44,1%, entre os vinte e um e quarenta anos, 23,3% entre os quarenta e um e sessenta anos e 6,2% acima de sessenta e um anos. A idade média de manifestação da doença foi de 32,8, variando de 2 anos a 82 anos.

Quando manifestaram a doença, 70,7% dos pacientes residiam no estado de Mato Grosso do Sul, 9,1% em Mato Grosso, 4,6% no Paraná, 4,1% no Paraguai, 2% em Goiás, 2% em Minas Gerais, 1,5% em Rondônia, 1,5% em São Paulo, 1% Espírito Santo, 0,5% no Acre, 0,5% no Amazonas, 0,5% na Argentina, 0,5% Distrito Federal, 0,5% em Pernambuco e 0,5% no Tocantins e 0,5% dos pacientes não sabia informar o local aonde ocorreram os primeiros sintomas da doença.

Neste trabalho, foram constituídas duas subamostras, denominadas euro-brasileiros (EU) composta por 97 pacientes (57,1%) e 262 controles (77,1%) e afro-brasileiros (AF) formada por 73 pacientes (42,9%) e 78 controles (22,9%).

Devido a problemas técnicos ou à má qualidade de algumas amostras de DNA, o número de indivíduos analisados para as variantes de determinados genes diferiu dos números acima mencionados, havendo uma variação do número de indivíduos analisados, dependendo da posição variável analisada.

Todos os indivíduos incluídos neste estudo assinaram um termo de consentimento após terem recebido explicações sobre os objetivos da pesquisa e de responderem a um questionário que continha informações relevantes para este estudo. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

4.2 Metodologia

4.2.1 Extração de DNA

Para as amostras coletadas no Hospital de Dermatologia Sanitária São Roque de Piraquara, e para as amostras coletadas no período de 2001-2004 no Hospital Adventista do Pênfigo, o DNA foi obtido pelo método de extração por fenol/clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1989). O DNA das demais amostras, obtidas no período de 1997 a 1998, foi extraído pelo método de *salting-out* (baseado em LAHIRI e NURNBERGER, 1991). Em todos os casos, a concentração das soluções de uso foi ajustada para 20µg/ml.

4.2.2 Genotipagem de *CD28*

4.2.2.1 Genotipagem do SNP -372 (G,A)

Para a genotipagem do SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) -372 (A,G) do gene *CD28* (Figura 7), a técnica utilizada foi PCR-RFLP (PCR - polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), utilizando-se a enzima de restrição *HinfI* (sítio de restrição: 5' G'ANTC 3'). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram (de acordo com TEUTSCH *et al.*, 2004):

- CD28-372FOR: 5' TTCTCATTCTGTTGCCCTGGC 3'
- CD28-372REV: 5' ATGTGCCCTAAGGGGATGGTG 3'

ttctcattctgttgccctggctggagtgagtgaggcatgatctcggctcatagcagcctccacctcc
 tgggttcaagcgatttccctgccttagcctccctagtagctgggattacaggtacccaccatgatg
 cctggctaattttttgtattttcaatggagacggggtttcaccatggtggccaggctcgtcttgac
 ctctggcctcaaatagatccaccactttggcctcccaaattgctggcattacaggcgtgagccac
 tgcacccggcctgttccttcttaagaacactttgttccccctttaatctctgctggatttcaagca
 ccccttttacacaactcttgatatccatcaataaagaataattcccataagcccatcatgtagtga
 ccgactatttttcagtgacaaaaaaaaagtccttaaaaaatagaagtaaaagtcTAAAGTCATCAAA
 ACAACGTTATATCCTGTGTGAAATGCTGCAGTCAGGATGCCTTGTGGTTTGAGTGCCTTGATCATG
 TGCCCTAAGGGGATGGTGCGGTGGTGGTGGC

Figura 7. Região 5'UTR e exon 1 do gene *CD28* (OMIM, 2004).

Em rosa, oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação.

Em vermelho, posição variável (G, A).

Sublinhado, sítio de restrição da enzima *HinfI*.

Em maiúscula, parte do exon 1 deste gene.

A mistura da reação para a amplificação da região que contém a posição variável é composta de tampão 1X (tris-HCl pH 9,0 600mM; sulfato de amônio 150mM e Tween 20 0,1%); MgCl₂ 1,5 mM; 0,2 mM de cada dNTP; 0,4μM de cada oligonucleotídeo iniciador; 0,65 U de Taq Polimerase (Invitrogen); 0,040 μg de DNA genômico e H₂O q.s.p. 15μl.

As amplificações foram realizadas no termociclador PTC-200 (MJ Research), com passo inicial de 3 minutos com temperatura de 95°C, 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 62°C e 40 segundos a 72°C, e um passo final de 5 minutos a 72°C.

O tamanho dos fragmentos resultantes é de 546 pb e a verificação da qualidade de amplificação foi feita através de gel de agarose 1,5%. A voltagem utilizada foi de, aproximadamente, 90V/cm². Uma alíquota de 2μl de corante azul de bromofenol (0,25% de bromofenol, 40% de sucrose em água destilada) foi aplicada no gel, que correu imerso em tampão TBE 0,5X. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5μg/ml) por 30min. As bandas foram visualizadas à luz ultravioleta.

Após a amplificação, os fragmentos foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *HinfI*. A mistura de reação consiste de tampão 1X, 4,5μl de produto de PCR, 1U da enzima de restrição. As digestões foram realizadas no termociclador PTC-200 (MJ Research), com temperatura de 37°C por 2 horas. Apenas o fragmento amplificado que contém a variante G é clivado, resultando em fragmentos de 78 e 468 pb (Figura 8). A genotipagem foi realizada

após corrida do produto digerido em gel de agarose 3,0%, corado com brometo de etídeo por 1 hora.

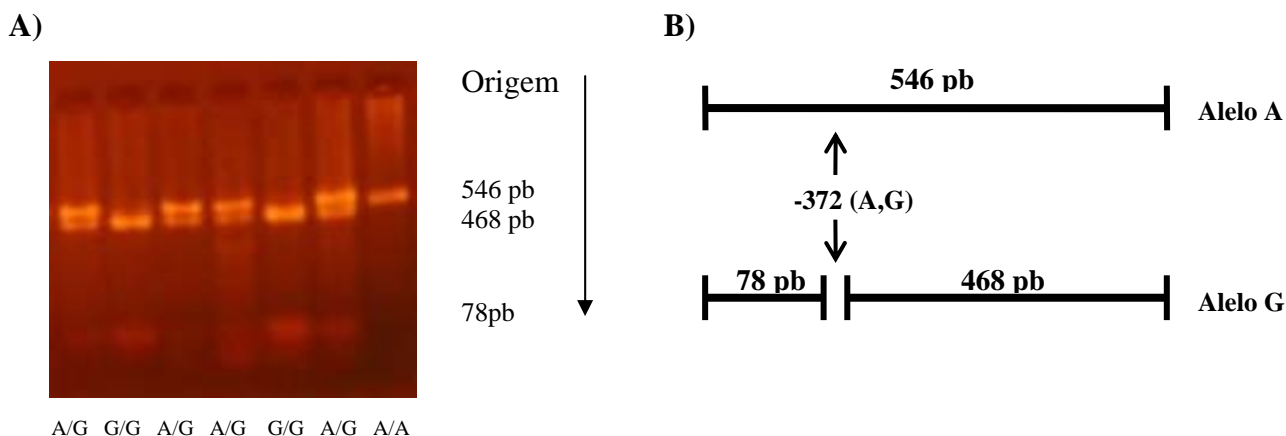


Figura 8. (A) Padrão de bandas obtido após eletroforese para os três genótipos possíveis (G/G, A/G, A/A), mostrando os tamanhos dos produtos de PCR. A seta indica o sentido da corrida. (B) Localização da posição variável -372 do gene *CD28*, no fragmento amplificado por PCR, mostrando o perfil de tamanho de bandas após a clivagem com a enzima de restrição *HinfI*.

4.2.2.2 Genotipagem da posição +17 (T,C)

Para o SNP localizado na posição 17 (T, C) do intron 3 (Figura 9), a técnica aplicada foi a PCR-ASO (PCR - oligonucleotídeos alelo-específicos). Esta técnica é realizada utilizando-se dois pares de oligonucleotídeos iniciadores: um par específico para o gene e o outro par específico para os alelos. A distinção entre estes é feita após corrida eletroforética em gel de agarose 3,0%, que separa os produtos de PCR de acordo com o tamanho (Figura 10).

Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a genotipagem dessa posição foram projetados no LGMH e são:

Oligonucleotídeos-iniciadores específicos para os alelos:

- CD28ESPF: 5' CTGGGTAAGAGAAGCAGCAAT 3'
- CD28ESPR: 5' GGAAAAGTTACATAAAAGCG 3'

Oligonucleotídeos-iniciadores específicos para o gene:

- CD28AMP1F: 5' GAAACACCTTTGTCCAAGTC 3'
- CD28AMP2R: 5' CTCAATGCCTTCTGGGAAATC 3'

```

ggaaatgcactcaattgctattcctgtatcatttaatccactctatTTTgtTTTTcaggg
aaacacctTTTgtccaagTccctatttcccggaccttctaagccctTTTgggtgctggtg
gtggttgggtggagtcttggttgctatagcttgctagtaacagtggccttattattttc

      T
tgggtaagagaagcagcaaggctTTTatgtaactTTTccactgcacatgaaatctgaaca
cattcaagaattTTTgcctatgtggtttattttctgtTTtaatataggatgatgattttctt
ttcccatgcttgagtaggttctcttttagcttgttcaactctatctgagataaaaatct
gatatgagttagatttcccagaaggcattgagtaggtggtgaggcaaaataagaagctaa
  
```

Figura 9. Localização dos oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação de parte do intron 3 do gene *CD28*. Em vermelho, localização dos oligonucleotídeos iniciadores não específicos. Em azul, localização do iniciador específico para a variante C. Em verde, localização do iniciador específico para a variante T. Em negrito e sublinhado, o nucleotídeo variável (T, C). (OMIM, 2004).

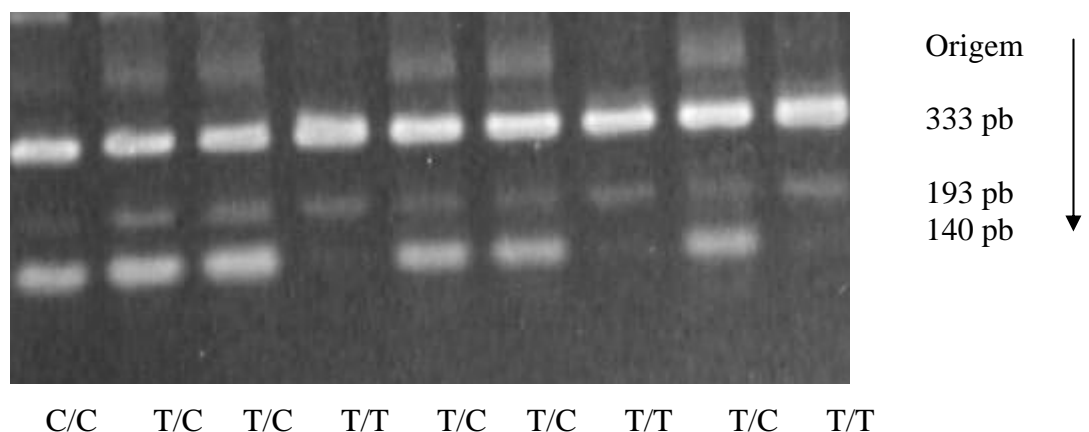


Figura 10. Padrão de bandas encontrado após corrida eletroforética em gel de agarose para genotipagem da posição 17 através da técnica de PCR-ASO, mostrando o tamanho dos produtos de PCR. A flecha indica o sentido da corrida.

As amplificações dos produtos para genotipagem dessa posição foram realizadas no termociclador PTC-200 (MJ Research), com passo inicial de 3 minutos com temperatura de 95°C, 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 54°C e 40 segundos a 72°C, e um passo final de 5 minutos a 72°C. As concentrações da mistura de reação são encontradas na Tabela 1.

TABELA 1. CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO QUE CONTÉM O INTRON 3 DO GENE *CD28* PELA TÉCNICA DE PCR-ASO.

Reagentes	Concentração		Quantidade para 1 amostra (µl)
	Inicial	Final	
Tampão Sulfato*	10 X	1 X	1,0
dNTP	2 mM	0,2mM	1,0 1
MgCl ₂	50 mM	2,0 mM	0,4
CD28ESPF1	20 µM	10 pmoles	0,5
CD28ESPF2	20 µM	10 pmoles	0,5
CD28AMP1F	20 µM	6 pmoles	0,3
CD28AMP2R	20 µM	6 pmoles	0,3
Taq Polimerase	5 U/µl	0,375 U	0,075
DNA	20 ng/ml	0,06 µg	3,0
H ₂ O			2
Volume Total			10

*Tampão sulfato: tris-HCl pH 9,0 600mM; sulfato de amônio 150mM e Tween 20 (0,1%).

Como não existem controles para assegurar a genotipagem correta destes indivíduos, a técnica de PCR-RFLP (PCR-polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) foi utilizada para gerar controles que permitam uma otimização segura da técnica de PCR-ASO. Nesse caso, a enzima de restrição utilizada foi a *AciI* (sítio de restrição: 5' CCGC 3'). Foram genotipados por essa técnica 160 indivíduos, cujo genótipo foi confirmado utilizando a técnica de PCR-ASO, que foi então empregada para a genotipagem das amostras restantes.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do segmento são os mesmos descritos acima (CD28AMP1F e CD28AMP2R). O tamanho do fragmento amplificado é de 333 pb. As condições de amplificação encontram-se na tabela 2.

TABELA 2. CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO QUE CONTÉM O INTRON 3 DO GENE *CD28* PELA TÉCNICA DE PCR-RFLP.

Reagentes	Concentração		Quantidade para 1 amostra (µl)
	Inicial	Final	
Tampão Sulfato*	10X	1X	1,2
dNTP	2mM	0,2 mM	1,2
MgCl ₂	50mM	1,5 mM	0,36
CD28AMP1F	20µM	6 pmoles	0,3
CD28AMP2R	20µM	6 pmoles	0,3
Taq Polimerase	5U/µl	0,375U	0,075
DNA	20ng/ml	0,06µg	3,0
H ₂ O			5,565
Volume Total			12

*Tampão sulfato: tris-HCl pH 9,0 600mM; sulfato de amônio 150mM e Tween 20 (0,1%).

As amplificações foram realizadas no termociclador PTC-200 (MJ Research), com passo inicial de 3 minutos com temperatura de 95°C, 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 40 segundos a 72°C, e um passo final de 5 minutos a 72°C. A verificação da qualidade de amplificação foi realizada através de gel de agarose 1,5%, após coloração com brometo de etídeo.

A mistura de reação consistia de tampão 1X, 4,5µl de produto de PCR, 2U da enzima de restrição. As digestões também foram realizadas no termociclador PTC-200 (MJ Research), com temperatura de 37°C por duas horas. O padrão de bandas obtido após digestão com a enzima de restrição encontra-se na figura 11. A distinção do tamanho das bandas e a genotipagem foram realizadas em gel de agarose 3,5%, com as mesmas condições estabelecidas para a posição -372, descrita no tópico acima.

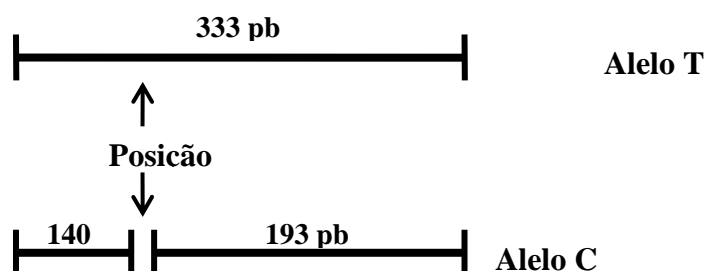


Figura 11. Localização da posição variável +17 do intron 3 do gene *CD28*, no fragmento amplificado por PCR, mostrando o perfil de tamanho de bandas após a clivagem com a enzima de restrição *AclI*.

4.2.3 Genotipagem de *CTLA4*

4.2.3.1. Genotipagem das posições -1722 e -1577

O segmento que contém os SNPs G,A e T,C, localizados nas posições -1577 e -1722, respectivamente, da região promotora do gene *CTLA4*, foi amplificado e genotipado pela técnica de PCR-RFLP (Figura 12).

Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação (TEUTSCH *et al.*, 2004) foram:

- CTLA4PROMFOR: 5' TCTGACTTCCACAGGCTGAAC 3'
- CTLA4PROMREV: 5' ATCTCCTCCAGGAAGCCTCTT 3'


```

ccctttctgacttccacaggctgaaccactggcttctgctcctctacataataacttcaat
tccagcattgatctcactctatcatgatcatgggttagctgtctgtcctgcccactgct
gtgtgttcctcttgagggcaggaacatttggttttctacttttttaaaaaacctctgttgcc
cagtcctggcattaggaagtgccattagggtgttattgcttggtggcgcttgagctgggg
cttgaaggtttctataatgtgtagcagtgtatagaaaacaggcagggtcagaaaaggcttc
tgtgcatcacaccaacatggcacatgtatacatatgtaacaaatctgcatgttgtgcaca
tgtaccctaaaacttaaagtataataataataaaaatttaaaaaaaaaaagaagaggctt
cctggaggagatgacagctgagctaagtcctggaggatgagaaggagtataaaataagat

```

Figura 12. Parte da região promotora do gene *CTLA4* (OMIM, 2004).

Em vermelho, oligonucleotídeos iniciadores para amplificação.

Em azul e sublinhado, localização da posição variante -1722 (T,C).

Em rosa e sublinhado, localização da posição variante -1577 (G,A).

As enzimas de restrição utilizadas são *BbvI* e *MboII*, cujos sítios de restrição incluem as posições -1722 e -1577, respectivamente. O tamanho do fragmento amplificado é de 427 pb. Para a posição -1722, apenas o alelo C é clivado, resultando em fragmentos de 98 e 329 pb. Já para a posição -1577, o alelo A é clivado, apresentando fragmentos de 242 e 185 pb (Figura 13).

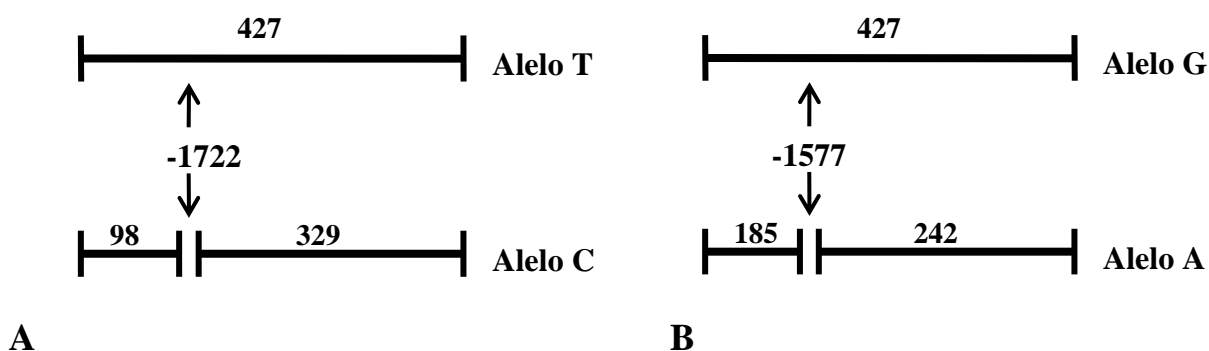


Figura 13. Representação esquemática do padrão de bandas resultantes da digestão do produto amplificado de parte da região promotora do gene *CTLA4* com as enzimas de restrição *BbvI* (A) e *MboII* (B).

Para um volume final de 25µl de produto amplificado, a concentração final dos reagentes foi: tampão 1X (tris-HCl pH 9,0 600mM; sulfato de amônio 150mM e Tween 20

[0,1%]); MgCl_2 1,5 mM; 0,2 mM de cada dNTP; 0,8 μM de cada oligonucleotídeo iniciador; 0,65 U de Taq Polimerase (Invitrogen); 0,08 μg de DNA genômico e H_2O .

As amplificações foram realizadas no termociclador PTC-200 (MJ Research), obedecendo às seguintes condições: a) 3 minutos a 95°C para desnaturação inicial; b) 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 62°C e 40 segundos a 72°C; c) 5 minutos a 72°C no final da ciclagem.

A verificação da qualidade de amplificação foi feita através de gel de agarose 1,5%, após coloração com brometo de etídeo.

Os fragmentos amplificados foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição respectivas. Para ambas, a mistura de reação consiste de tampão 1X, 4,5 μl de produto de PCR, 1U da enzima de restrição respectiva. As digestões também foram realizadas no termociclador PTC-200 (MJ Research), com temperatura de 37°C para a enzima *Mbo*II e 65°C para a enzima de restrição *Bbv*I durante o período de duas horas.

4.2.3.2. Genotipagem da posição +49

Para a amplificação do segmento do gene *CTLA4* que contém parte da região promotora e parte do exon 1, a técnica utilizada foi a PCR-NESTED, cuja amplificação ocorre em duas etapas.

Na primeira, as seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram:

CTLA4-7: 5' GGATTTAGGAGGACCCTTGTA 3'

CTLA4-10: 5' AAACACCTCCTCCATCTTCAT 3'

O tamanho do fragmento amplificado é de 532pb.

A mistura da reação é composta de tampão 1X (tris-HCl pH 9,0 600mM; sulfato de amônio 150mM e Tween 20 0,1%); 1,5 mM de MgCl_2 ; 0,2 mM de cada dNTP; 0,5 μM de cada oligonucleotídeo iniciador; 0,375 U de Taq Polimerase (Invitrogen); 0,060 μg de DNA genômico e H_2O q.s.p. 15 μl .

As amplificações foram realizadas no termociclador PTC-200 (MJ Research), com um passo inicial de 3 minutos com temperatura de 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C e um minuto a 72°C, e um passo final de 5 minutos a 72°C.

Na segunda etapa, o mesmo oligonucleotídeo iniciador a 5' (CTLA4-7) foi utilizado. A sequência do oligonucleotídeo iniciador a 3' é:

CTLA4-8: 5' CTTTGCAGAAGACAGGGATGAA 3'

O tamanho do fragmento amplificado é de 491pb. A composição da mistura de reação é a mesma, com exceção da quantidade de DNA utilizado. Foi utilizado 0,5µl do material amplificado na primeira etapa, para um volume final de 15 µl. As amplificações também foram realizadas no mesmo termociclador da primeira etapa, e as mesmas condições de ciclagem foram utilizadas, com exceção da temperatura de anelamento que foi de 45°C.

A genotipagem foi realizada através de PCR-SSOP (PCR seguida de hibridação com oligonucleotídeos sequência específica).

Após a amplificação das amostras, foram realizadas corridas eletroforéticas em gel de agarose 1,5%, procurando verificar a qualidade e a intensidade do produto amplificado. Em seguida, 1,5µl dos produtos amplificados foram aplicados em membranas de náilon carregadas positivamente (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech). Após a aplicação, as membranas foram imersas por 5 min em solução de NaOH 0,4N à temperatura ambiente, para desnaturação do DNA. Em seguida, as membranas foram neutralizadas em solução de SSPE 3X por 10 minutos à temperatura ambiente. Depois de secas (aproximadamente 30 minutos a 37°C), o DNA foi fixado por calor a 80°C por 2 horas.

Os oligonucleotídeos-sonda utilizados para a discriminação genotípica foram sintetizados e marcados com biotina pelo fornecedor (Bio-Synthesis) e são:

CTLA4+49A: 5' CCTGGCTACCAGGAC 3'

CTLA4+49G: 5' CCTGGCTGCCAGGAC 3'

As hibridações foram realizadas em fornos Hybaid. O protocolo de hibridação compreendeu as seguintes etapas:

A- Pré-hibridação (realizada à temperatura de 40°C):

- 1) Hidratação das membranas em 10ml de SSPE 4X por 10min;
- 2) Pré-hibridação em 10ml de solução de TMAC (Tris-HCl, pH 8,0 50mM; SDS 0,1%; EDTA dissódico pH 8,0, 2 mM; cloreto de amônio tetrametilado – TMAC – 3M) por 30 minutos;

B- Hibridação (realizada à temperatura de 40°C):

- 3) Hibridação em solução de TMAC contendo 4nM de oligonucleotídeo-sonda biotinilado por 2 horas;

C- Lavagem:

- 4) Lavagem em 10ml de SSPE 2X, SDS 0,1% durante 10 minutos a 37°C, por duas vezes;
- 5) Lavagem em 10ml de solução de TMAC durante 20 minutos a 50°C;
- 6) Lavagem em 10ml de SSPE 3X, SDS 0,5% por 10 minutos a 37°C;

D- Revelação (realizada à temperatura de 37°C):

- 7) Incubação em 10ml de solução contendo o conjugado HRP-SA (0,5µg/ml) por 30 minutos;
- 8) Lavagem em 10ml de SSPE 1X, SDS 0,1% durante 10 minutos, por duas vezes;
- 9) Acidificação da membrana em 10ml de tampão citrato (citrato trissódico 0,1 M, pH 5,0, ajustado com ácido cítrico monohidratado) por 5 minutos;
- 10) Reação colorimétrica em 3 ml da solução [5 ml de tampão citrato; 5µl de H₂O; 150 µl de solução de TMB (2mg/ml de H₂O)] por 5 minutos, na ausência da luz;
- 11) Interrupção com água destilada.

Foi dado um escore a cada sinal obtido, dependendo de sua intensidade. Sinais considerados positivos receberam “9”, “8”, ou “6”, sendo “9” o mais forte. “4” foi dado a um sinal não tão forte, que dependeu de outras análises para que fosse considerado positivo ou negativo. “1” era ausência de sinal e “2”, um sinal tão fraco, que era considerado negativo.

Realizada a leitura, as membranas foram fotocopiadas e, em seguida, descoloridas com etanol 80% até a completa descoloração. A desibridação foi feita com NaOH 0,4N a 42°C por 30 minutos. Em seguida, a solução foi retirada, sendo substituída por solução de Tris-HCl pH 7,5 0,2 M; SDS 0,5%; SSPE 0,1X, que permaneceu à mesma temperatura e tempo que a solução anterior. Terminado o processo, as membranas foram guardadas úmidas, seladas em plástico.

4.2.3.3. Genotipagem do SNP CT60

Para o SNP CT60 (G,A), localizado na região 3'UTR, posição +6320, a técnica utilizada foi a PCR-RFLP, com a enzima de restrição *HpyCH4IV* (sítio de restrição 5' A'CGT 3'). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação desta região foram projetados no Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH) e se encontram na figura 14.

```
aattaaataaaaatctgtggtggtcgttttccggagttgtctttatcatccttgcatTTg
aatattgtgttttaaatttttgattgattcattcagtatctggtggagtcctcaatattag
aaatactggaaacaaactgaaaaaccacaaaaggacaaataatgcttcatgagtcagctt
tgcaccagccattacctgcaagtcattcttggaggatccatcctctttccttttgatt
tcttcaccactatTTTgggatataacgtgggttaacacagacatagcagtcctttataaat
caattggcatgctgtttaaacacagggttcttcacctccccctttcttaccgcctgctttctc
agctcaactatcacaggcattacagttgtcatggcaaccccaatgTTTggcaaccacgtcc
cttgcagccattttgatctgccttcttgaaatatagagcttttccctgtggcttccaaat
gaactatTTTgcaaatgtggggaaaacacacacctgtggtcctatgTTTgctatcagctgg
cacacctaggcctggcacactaagccctctgtgattcttTgcttaaccaatgtatagtctc
agcacatttgggtttccacttaaggtttcctatTTTtgacctccacatcctgttattgtct
```

Figura 14. Parte da região 3'UTR do gene *CTLA4* (OMIM, 2004).

Em vermelho, oligonucleotídeos iniciadores para amplificação.

Em azul e sublinhado, posição variável CT60 (G,A).

Para a amplificação desta região, as reações foram realizadas em um volume final de 15 µl, contendo tampão 1X (tris-HCl pH 9,0 600mM; sulfato de amônio 150mM e Tween 20 [0,1%]); MgCl₂ 1,5 mM; 0,2 mM de cada dNTP; 0,3 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; 0,5 U de Taq Polimerase (Invitrogen); 0,03µg de DNA genômico e H₂O.

As amplificações foram realizadas no termociclador PTC-200 (MJ Research) com um ciclo de 3 minutos a 95°C para desnaturação inicial, 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 62°C e 40 segundos a 72°C e 5 minutos a 72°C no final da ciclagem.

Após a amplificação, os produtos foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% e corados com brometo de etídeo para verificação da qualidade da reação.

Em seguida foi feita a digestão dos produtos de PCR. A região amplificada contém dois sítios de restrição para essa enzima, sendo um deles monomórfico e o outro específico

para a variante G. Esse corte na posição monomórfica garante uma maior confiabilidade nos resultados obtidos, uma vez que possibilita a verificação de falha da enzima ou se está havendo digestão parcial.

A digestão também foi realizada no termociclador PTC-200 (MJ Research), a 65°C durante 2 horas, sendo que o protocolo consistia de tampão 1X, 4,5µl de produto de PCR, 0,5 U da enzima de restrição. A genotipagem foi realizada observando-se o padrão de bandas gerado após corrida em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídeo. O padrão de bandas correspondente a cada genótipo encontra-se na figura 15.

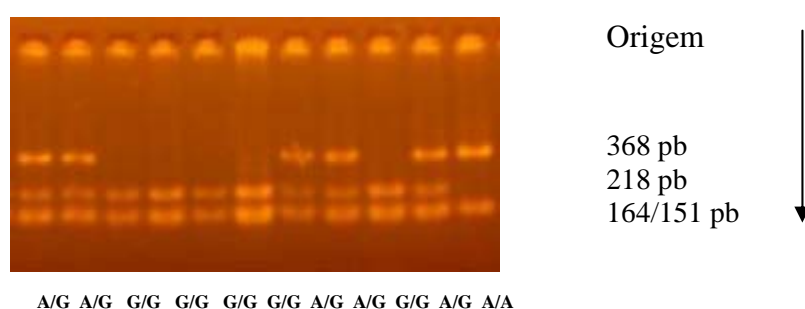


Figura 15. Gel de agarose corado com brometo de etídeo mostrando o padrão de bandas obtido após a digestão do segmento amplificado com a enzima de restrição *HpyCH4IV*. A flecha indica sentido da corrida.

4.2.4 Genotipagem dos locos microssatélites *CD28 (CAA)_n*, *CTLA4 (TA)_n* e *D2S72*

A análise genotípica dos locos microssatélites *CD28 (CAA)_n*, *CTLA4 (TA)_n* e *D2S72* (Figuras 16, 17 e 18) foi feita utilizando-se o seqüenciador automático MegaBACE 1000 (GE healthcare), através de uma análise multiplex com oligonucleotídeos iniciadores marcados com fluorescência (Tabela 3).

```

tgccaagaggctgaggcatgagaatcgcttgaacctggcaggcgagggttgcagt
gagccgagatagtgccacagctctccagcctgggcgacagagtgcagactccatctc
aaacaacaacaacaacaacaacaaccacaaaattatttgagtactg
tgaaggattatttgtctaacagttcattccaatcagaccaggtaggagcttctctg
tttcatat

```

Figura 16. Parte da região 3'UTR do gene *CD28*.

Em azul, repetição trinucleotídica (CAA)_n.

Em vermelho, oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação desta região.

Os vários segmentos foram amplificados simultaneamente na PCR. A genotipagem foi feita por diferenças nos tamanhos dos produtos amplificados e na marcação diferenciada para cada loco. Na tabela 4 são mostradas as condições de amplificação para esses três locos.

TABELA 4. CONDIÇÕES PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS LOCOS MICROSSATÉLITES.

Reagentes	Concentração inicial	Concentração final	Quantidade para 1 amostra (µl)
Tampão sulfato	10 x	1 x	1,0
dNTP	2,0 mM	0,2 mM	1,0
MgCl ₂	50 mM	2,0 mM	0,4
CD28 Fwd	20 µM	0,3 µM	0,15
CD28 Rev	20 µM	0,3 µM	0,15
CTLA4 Fwd	20 µM	0,45 µM	0,225
CTLA4 Rev	20 µM	0,45 µM	0,225
D2S72 Fwd	20 µM	0,45 µM	0,225
D2S72 Rev	20 µM	0,45 µM	0,225
DNA Polimerase	5U/µl	0,25 U	0,05
DNA	20 ng/ml	0,06 µg	3,0
H ₂ O			3,5
Volume total			10

A determinação dos genótipos foi feita com o auxílio do programa *Fragment Profiler v.1.2*.

Depois de feita a amplificação, os produtos de PCR foram diluídos em água ultrapura, numa proporção de 2 µl de água para 4 µl de produto de PCR. Para a injeção no aparelho seqüenciador MegaBACE 1000, 2µl do produto de PCR diluído foram misturados a 8 µl de solução composta por Tween 0,2 e pelo marcador de tamanho ETROX-400. Posteriormente as amostras eram desnaturadas a 94°C por 3 minutos em aparelho termociclador e rapidamente resfriadas para que não houvesse renaturação e eram mantidas em gelo até a injeção no aparelho seqüenciador. As figuras 19, 20 e 21 trazem exemplos de visualização dos resultados para os locos *CD28 (CAA)_n*, *CTLA4 (TA)_n* e *D2S72*, respectivamente.

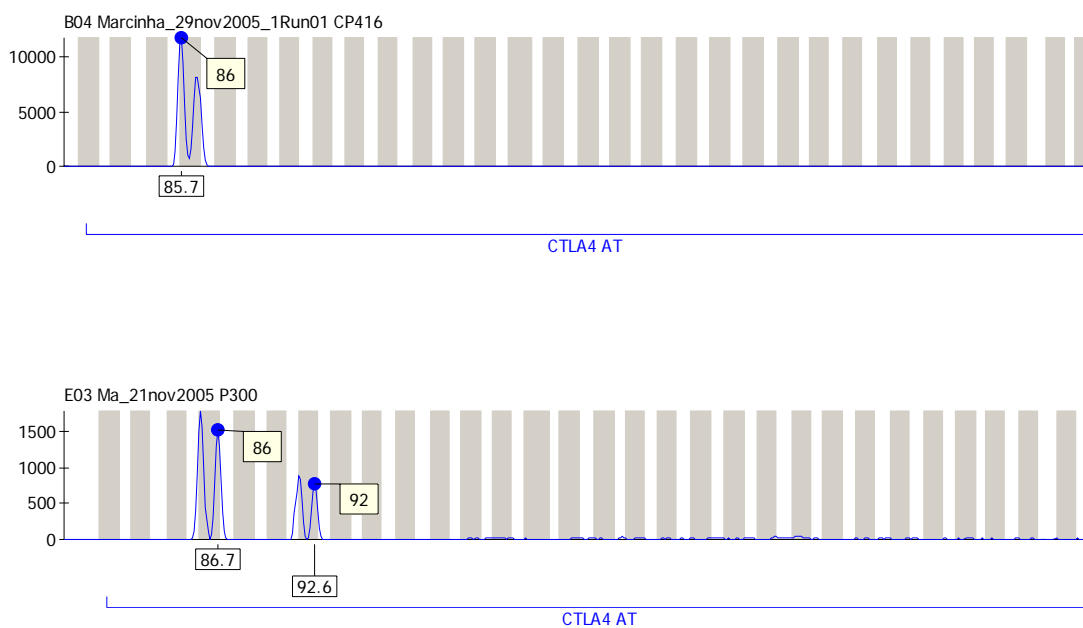


Figura 19. Padrão de picos encontrados para a genotipagem do loco microssatélite *CTLA4* (TA)n. São mostrados indivíduos com genótipo homozigoto 86/86 e heterozigoto 86/92.

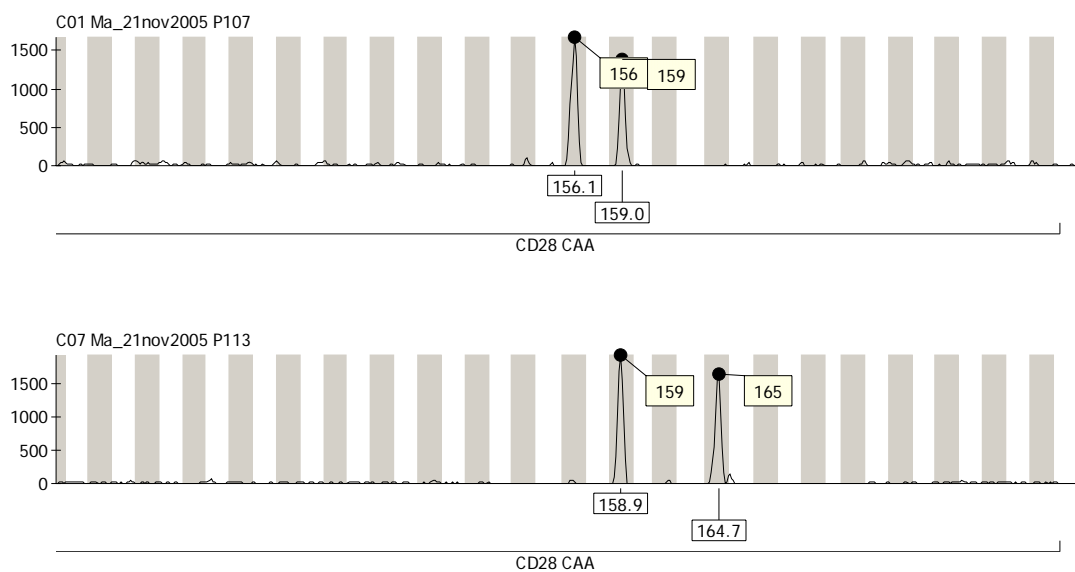


Figura 20. Padrão de picos encontrados para a genotipagem do loco microssatélite *CD28* (CAA)n. São mostrados indivíduos com genótipos heterozigotos 156/159 (acima) e 159/165.

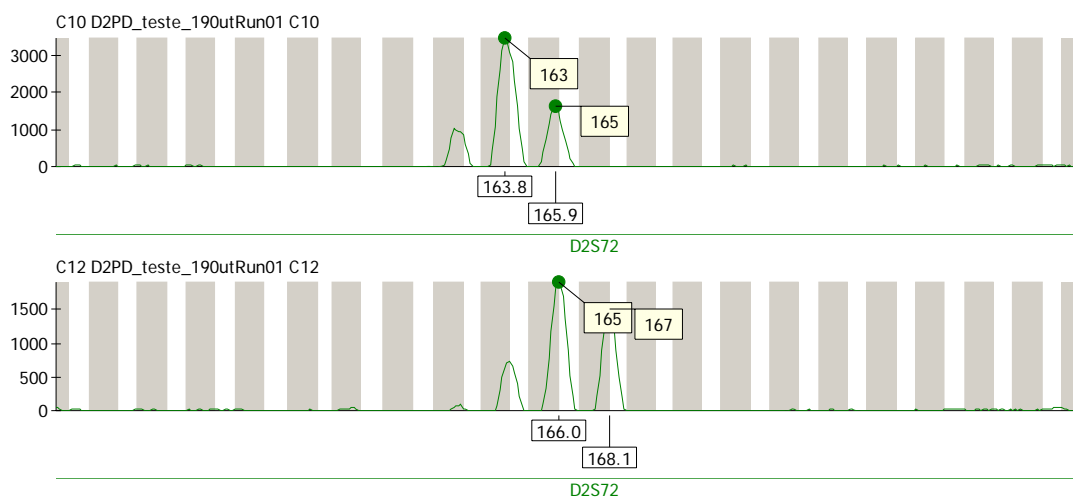


Figura 21. Padrão de picos encontrados para a genotipagem do loco microssatélite *D2S72*. São mostrados indivíduos com genótipos heterozigotos *163/165* e *165/167*.

4.2.5 Análise Estatística

Os genótipos obtidos através das tipagens de todos os indivíduos foram armazenados em um banco de dados, em formato Access. Pelo programa CONVERT 1.1 (PROBST, 1998), foram obtidas as frequências genotípicas e os arquivos de entrada de dados para a posterior utilização pelo pacote de programas ARLEQUIN v. 2.0 (SCHNEIDER *et al.*, 2000). Com este pacote de programas foram estimadas as frequências alélicas para cada SNP e as frequências haplotípicas. Também foram comparadas as frequências genotípicas observadas com as esperadas segundo o teorema de Hardy e Weinberg, através do método de GUO e THOMPSON (1992). As frequências de indivíduos portadores de cada variante foram obtidas por contagem direta.

As frequências alélicas, genotípicas e de indivíduos portadores foram comparadas entre pacientes e indivíduos-controle e as significâncias dos desvios foram verificadas através do teste exato de Fisher, pelo algoritmo Metropolis, utilizando o programa RXC (MILLER, 1997). Diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$) indicam associação positiva ou negativa da variante com a doença. Esse programa também foi utilizado para comparações entre os grupos controles (grupo controle coletado especificamente para o projeto pênfigo e grupo controle do LGMH) e comparar as amostras EU e AF nos grupos pacientes e controles.

Foi realizado o cálculo de OR (“odds ratio”), $OR = (A \times D) / (B \times C)$ (WOOLF, 1955), sendo os valores A, B, C e D os mesmos indicados na seguinte tabela:

	Pacientes	Controles
Positivo para o fator pesquisado	A	B
Negativo para o fator pesquisado	C	D

Caso o valor de uma das células seja zero, usa-se a correção de Haldane, cuja formula é: $OR = [(A+0,5).(D+0,5)/(B+0,5).(C+0,5)]$.

O valor da OR para doenças raras se aproxima do valor de risco relativo (RR), que reflete quantas vezes a doença é mais freqüente entre os portadores de um determinado fator, em comparação com indivíduos sem o fator (SVEJGAARD *et al.*, 1974). Valores de OR iguais a 1 significam ausência de associação do fator analisado com a doença em questão. Já valores acima de 1 indicam uma maior probabilidade de desenvolver a doença, e valores menores que 1 revelam que o fator confere proteção contra o desenvolvimento da patologia.

Nas análises dos microssatélites e de haplótipos, apenas foi calculada OR e *P* quando se verificava a ocorrência do alelo ou haplótipo em pelo menos 3 indivíduos de pelo menos uma das amostras (pacientes ou controles).

5 RESULTADOS

5.1 Análise individual do SNP -372 (A,G) do gene *CD28*

Para este SNP foram genotipados 138 pacientes e 254 indivíduos-controle. Inicialmente, foram analisadas separadamente a amostra de origem predominantemente européia (EU) e a amostra de origem predominantemente africana (AF). Dentro de cada um desses grupos foi realizado um teste de homogeneidade para comparar as frequências alélicas da amostra controle coletada especialmente para o projeto sobre pênfigo com a amostra controle pertencentes ao Painel do Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH). Não houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,140$ para o grupo EU e $P=0,125$ para o grupo AF) entre as comparações. Sendo assim possível reuni-los em um grande grupo controle.

Foram comparadas as frequências alélicas entre amostras de pacientes EU e AF e também entre amostras de indivíduos-controle EU e AF. Não houve diferença estatisticamente significativa entre estes ($P=1,000$ para controles e $P=0,262$ para pacientes). Dessa forma, foi possível reunir os dois grupos formando assim um grande grupo, denominado de amostra total. Todos os grupos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) (Tabela 5).

Foram comparadas as frequências alélicas, genotípicas e de portadores de cada alelo entre pacientes e indivíduos-controle para os grupos EU, AF e também para a amostra total (Tabela 5). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes em qualquer uma das comparações.

TABELA 5. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DA POSIÇÃO -372 (A,G) DO GENE *CD28*.

	Total					EU					AF				
Frequências	Pac n=138 %	Con n=254 %	OR	IC 95%	P	Pac n=78 %	Con n=200 %	OR	IC 95%	P	Pac n=60 %	Con n=54 %	OR	IC 95%	P
Alélicas															
CD28 -372 A	33,3	34,6	0,94	0,69-1,29	0,745	35,9	34,7	1,05	0,71-1,55	0,846	30,0	34,3	0,82	0,47-1,44	0,565
CD28 -372 G	66,7	65,4	1,06	0,78-1,45		64,1	65,3	0,95	0,65-1,40		70,0	65,7	1,22	0,70-2,12	
Portadores															
CD28 -372 A	53,6	59,8	0,78	0,51-1,18	0,249	56,4	59,5	0,88	0,52-1,50	0,683	50,0	61,1	0,64	0,30-1,34	0,266
CD28 -372 G	87,0	90,6	0,70	0,36-1,33	0,297	84,6	90,0	0,61	0,28-1,32	0,211	90,0	92,6	0,72	0,19-2,70	0,749
Genotípicas															
A/A	13,0	9,4	1,44	0,75-2,75	0,307	15,4	10,0	1,64	0,76-3,53	0,211	10,0	7,4	1,39	0,37-5,21	0,749
A/G	40,6	50,4	0,67	0,44-1,02	0,070	41,0	49,5	0,71	0,42-1,21	0,209	40,0	53,7	0,57	0,27-1,21	0,202
G/G	46,4	40,2	1,29	0,85-1,96	0,252	43,6	40,5	1,14	0,67-1,93	0,690	50	38,9	1,57	0,75-3,31	0,261
Equilíbrio H-W (P)	0,337	0,095				0,476	0,265			0,230	0,756				

Pac: Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds ratio; **IC:** Intervalo de Confiança, ***P*:** Probabilidade.

5.2 Análise individual da posição +17 (C,T) do intron 3 do gene *CD28*

Para esta posição foram tipados 149 pacientes e 290 indivíduos-controle. O teste de homogeneidade para os dois sub-grupos de controles mostrou ausência de diferença estatisticamente significativa ($P= 0,352$ para o grupo EU e $P= 0,765$ para o grupo AF).

O teste de homogeneidade entre as frequências alélicas de pacientes EU e AF e entre indivíduos-controle EU e AF também mostrou ausência de diferença estatisticamente significativa ($P= 0,266$ para controles e $P= 0,093$ para pacientes). Todos os grupos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 6).

As frequências alélicas, genotípicas e de indivíduos portadores dos diferentes alelos foram comparadas entre pacientes e controles (Tabela 6). Não foram encontradas associações entre as variantes do SNP 17 e PF endêmico.

TABELA 6. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DA POSIÇÃO +17 (C,T) DO INTRON 3 DO GENE *CD28*.

	Total					EU					AF				
Frequências	Pac n=149 %	Con n=290 %	OR	IC 95%	P	Pac n=84 %	Con n=222 %	OR	IC 95%	P	Pac n=65 %	Con n=68 %	OR	IC 95%	P
Alélicas															
CD28 INT3 T	81,9	81,0	1,06	0,74-1,52	0,784	78,6	80,0	0,92	0,59-1,42	0,733	84,6	86,2	1,14	0,57-2,25	0,737
CD28 INT3 C	18,1	19,0	0,49	0,34-0,71		21,4	20,0	1,09	0,70-1,68		15,4	13,8	0,88	0,45-1,74	
Portadores															
CD28 INT3 T	95,3	95,9	0,58	0,34-2,27	0,803	35,1	95,0	0,68	0,24-1,89	0,578	98,5	98,5	0,96	0,06-15,6	1,000
CD28 INT3 C	31,5	33,8	0,90	0,59-1,38	0,671	35,7	35,1	1,03	0,61-1,73	1,000	26,2	29,4	0,85	0,40-1,82	0,698
Genotípicas															
T/T	68,5	66,2	1,11	0,73-1,69	0,659	64,3	64,8	0,98	0,58-1,65	1,000	73,9	70,6	1,18	0,55-2,52	0,707
T/C	26,8	29,7	0,87	0,56-1,35	0,583	28,6	30,2	0,93	0,53-1,61	0,887	24,6	27,9	0,84	0,39-1,83	0,688
C/C	4,7	4,1	1,14	0,44-2,96	0,808	7,1	5,0	1,48	0,53-4,13	0,573	1,5	1,5	1,05	0,06-17,1	1,000
Equilíbrio H-W (P)	0,272	0,574				0,196	0,405				~1,00	~1,00			

Pac: Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds ratio; **IC:** Intervalo de Confiança, ***P*:** Probabilidade.

5.3 Análise individual do loco microsatélite *CD28 (CAA)_n*

Para esse loco, foram analisados 312 indivíduos-controle e 139 pacientes. Foram encontrados 9 alelos na população estudada, sendo eles: *147, *153, *156, *159, *162, *165, *168, *171, *174 (Tabela 7).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a amostra controle coletada especificamente para o projeto sobre pênfigo e a amostra controle do painel do LGMH ($P=0,160$ para o grupo EU e $P=1,000$ para o grupo AF).

Na comparação das frequências alélicas entre pacientes EU e AF e controles EU e AF, também não houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,800$ para controles e $P=1,000$ para pacientes). Todos os grupos encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 7).

Diferenças estatisticamente significantes entre pacientes e indivíduos-controle foram encontradas para o alelo *159 e para o estado de portador desse alelo na amostra EU (OR= 3,60 e 3,72, respectivamente) (Tabelas 7 e 8). As frequências genotípicas não diferem entre pacientes e controles (Tabela 9).

TABELA 7. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE *CD28 (CAA)n*.

Alelos	Total					EU					AF				
	Pac n=139 %	Con n=312 %	OR	IC 95%	P	Pac n=80 %	Con n=239 %	OR	IC 95%	P	Pac n=61 %	Con n=54 %	OR	IC 95%	P
<i>*147</i>	0,0	0,2	NA	NA	NA	0,0	0,2	NA	NA	NA	0,0	0,0	---	---	---
<i>*153</i>	0,4	0,9	0,37	0,04-3,10	0,68	0,0	0,8	0,37	0,02-7,02	0,58	0,8	1,4	0,62	0,06-6,87	~1,00
<i>*156</i>	82,4	81,4	1,07	0,74-1,54	0,78	81,9	81,2	1,05	0,66-1,66	0,91	83,1	82,2	0,61	0,56-2,02	0,88
<i>*159</i>	3,6	1,9	1,90	0,81-4,46	0,16	4,4	1,3	3,60	1,19-10,8	0,03	2,5	4,1	1,88	0,15-2,49	0,73
<i>*162</i>	1,4	0,8	1,81	0,48-6,78	0,46	0,0	0,4	NA	NA	NA	3,4	2,0	1,67	0,37-7,62	0,70
<i>*165</i>	1,4	1,4	1,12	0,34-3,76	1,00	0,6	1,5	0,42	0,05-3,47	0,69	2,5	1,4	1,88	0,31-11,4	0,66
<i>*168</i>	2,9	4,5	0,63	0,28-1,40	0,35	3,1	5,0	1,26	0,47-3,41	0,60	2,5	2,7	0,93	0,20-4,22	1,00
<i>*171</i>	7,9	8,7	0,95	0,56-1,59	0,89	10,0	9,4	1,07	0,59-1,95	0,88	5,1	6,2	0,82	0,28-2,36	0,79
<i>*174</i>	0,0	0,2	NA	NA	NA	0,0	0,2	NA	NA	NA	0,0	0,0	---	---	---
Equilíbrio H-W (P)	0,393	0,473				0,281	0,429				0,588	0,719			

Pac: Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds ratio; **IC:** Intervalo de Confiança, **P:** Probabilidade, **NA:** não analisado.

TABELA 8. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO AS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE *CD28 (CAA)*_n.

Portadores	Total					EU					AF				
	Pac n=139 %	Con n=312 %	OR	IC 95%	P	Pac n=80 %	Con n=239 %	OR	IC 95%	P	Pac n=61 %	Con n=54 %	OR	IC 95%	P
<i>*153</i>	0,7	1,9	0,37	0,04-3,10	0,68	1,7	0,0	0,33	0,02-6,10	0,57	0,7	2,7	NA	NA	NA
<i>*156</i>	96,4	96,8	0,89	0,30-2,65	0,78	95,0	96,2	0,74	0,22-2,48	0,75	98,3	98,6	0,81	0,05-13,2	1,00
<i>*159</i>	7,2	3,8	1,94	0,82-4,60	0,16	8,7	2,5	3,72	1,21-11,4	0,02	5,1	8,2	0,60	0,14-2,50	0,73
<i>*165</i>	2,9	2,9	1,00	0,30-3,31	1,00	1,2	2,9	2,94	1,00-8,63	0,69	5,1	2,7	1,90	0,31-11,8	0,66
<i>*168</i>	5,8	9,0	0,62	0,27-1,40	0,35	6,3	10,0	0,60	0,22-1,62	0,37	5,1	5,5	0,92	0,20-4,30	1,00
<i>*171</i>	15,1	16,7	0,89	0,51-1,54	0,78	18,8	18,0	1,05	0,55-2,02	0,87	10,2	12,3	0,81	0,27-2,41	0,79

Pac: Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** *Odds ratio*; **IC:** Intervalo de Confiança, **P:** Probabilidade, **NA:** não analisado.

TABELA 9. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO AOS GENÓTIPOS MAIS FREQUENTES ENCONTRADOS PARA O LOCO MICROSSATÉLITE *CD28* (CAA)*n*.

Genótipos	Total					EU					AF				
	Pac n=139 %	Con n=312 %	OR	IC 95%	<i>P</i>	Pac n=80 %	Con n=239 %	OR	IC 95%	<i>P</i>	Pac n=61 %	Con n=54 %	OR	IC 95%	<i>P</i>
<i>156/156</i>	68,3	66,0	1,11	0,72-1,70	0,67	68,75	66,1	1,13	0,66-1,94	0,68	67,8	65,8	1,10	0,53-2,27	0,86
<i>156/171</i>	12,2	14,1	0,85	0,47-1,55	0,65	13,75	14,6	0,93	0,45-1,93	1,00	10,2	12,3	0,81	0,27-2,41	0,79
<i>156/165</i>	2,2	2,6	0,84	0,22-3,21	1,00	1,25	2,5	0,49	0,06-4,15	0,69	3,4	2,7	1,25	0,17-9,12	1,00
<i>156/168</i>	5,8	8,0	0,70	0,31-1,60	0,44	6,25	8,8	0,69	0,25-1,90	0,64	5,1	5,5	0,92	0,20-4,30	1,00
<i>156/159</i>	4,3	3,2	1,36	0,49-3,83	0,59	5,0	2,1	0,41	0,11-1,55	0,24	3,4	6,8	0,48	0,09-2,55	0,46
Outros	7,2	6,1	NA	NA	NA	5,0	5,9	NA	NA	NA	10,1	6,9	NA	NA	NA

Pac: Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** *Odds ratio*; **IC:** Intervalo de Confiança, ***P*:** Probabilidade; **NA:** não analisado

5.4 Análise dos haplótipos do gene *CD28*

Foi realizada a análise dos haplótipos para todas as posições do gene *CD28* genotipadas nesse trabalho. Quando analisados os haplótipos considerando as três posições estudadas para o gene *CD28* (-372, 17 e microssatélite), observou-se associação positiva com o haplótipo A_C_156 (OR = 5,70) e associação negativa com o haplótipo G_C_168 (OR = 0,31) na amostra EU. Na análise da amostra total, verificou-se associação positiva com o haplótipo A_C_165 (Tabela 10).

Todas as possíveis combinações de alelos de duas posições polimorfas do gene *CD28* também foram analisadas (tabelas 10, 11, 12 e 13). Porém, nenhum dos haplótipos está associado positiva-ou negativamente com o PF endêmico.

TABELA 10. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO AS FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS.

			Total					EU					AF				
-372	INT	MIC	Pacientes n=109 %	Controles n=227 %	OR	IC 95%	P	Pacientes n=63 %	Controles n=175 %	OR	IC 95%	P	Pacientes n=46 %	Controles n=52 %	OR	IC 95%	P
A	C	156	2,0	0,7	2,81	0,62-12,7	0,219	2,9	0,6	5,70	1,03-31,5	0,041	0,0	0,0	---	---	---
A	C	165	2,0	0,0	19,7	1,02-355	0,011	0,0	0,0	---	---	---	3,3	0,0	NA	NA	NA
A	C	171	0,0	0,7	2,81	0,62-12,7	0,555	0,0	0,9	0,39	0,02-7,65	0,572	0,0	0,0	---	---	---
A	T	156	29,8	32,3	0,90	0,63-1,27	0,616	31,3	32,6	0,93	0,60-1,44	0,824	27,4	29,6	0,88	0,47-1,64	0,747
A	T	159	0,9	0,0	10,5	0,50-219	0,106	1,6	0,0	14,08	0,67-295	0,069	0,0	0,0	---	---	---
G	C	156	2,0	1,3	1,40	0,39-5,00	0,734	1,1	0,9	0,93	0,10-8,98	~1,00	2,2	2,7	0,75	0,12-4,58	~1,00
G	C	165	0,0	1,3	0,16	0,01-2,82	0,184	0,0	1,1	0,30	0,02-5,69	0,577	0,0	1,9	NA	NA	NA
G	C	168	3,2	4,6	0,68	0,29-1,63	0,526	3,2	5,4	0,31	0,11-0,94	0,028	3,3	0,0	NA	NA	NA
G	C	171	6,0	8,1	0,71	0,37-1,37	0,337	8,7	8,2	1,06	0,51-2,19	0,855	2,4	7,7	0,27	0,06-1,29	0,109
G	T	156	49,1	46,4	1,12	0,81-1,55	0,508	48,9	46,6	1,11	0,74-1,67	0,663	49,7	47,3	1,46	0,83-2,56	0,209
G	T	159	2,0	2,0	0,92	0,28-3,04	~1,00	1,6	1,4	1,11	0,21-5,81	~1,00	2,2	3,8	0,56	0,10-3,11	0,689
G	T	162	2,0	0,9	2,10	0,52-8,49	0,284	0,0	0,6	0,55	0,03-11,56	~1,00	4,3	2,0	2,93	0,55-15,5	0,257
Outros			1,0	1,7	NA	NA	NA	0,7	1,7	NA	NA	NA	5,2	5,0	NA	NA	NA

OR: Odds ratio; **IC:** Intervalo de Confiança, **P:** Probabilidade; **NA:** não analisado; **INT:** Posição 17 do intron 3; **MIC:** CD28 (CAA)*n*.

TABELA 11. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO AS FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS DA POSIÇÃO 17 (C, T) E DO LOCO MICROSSATÉLITE *CD28* (*CAA*)_n DO GENE *CD28*.

INT	MIC	Total					EU					AF				
		Pacientes n=129 %	Controles n=273 %	OR	IC 95%	P	Pacientes n=74 %	Controles n=209 %	OR	IC 95%	P	Pacientes n=55 %	Controles n=64 %	OR	IC 95%	P
C	156	4,3	3,8	1,58	0,71-3,48	0,286	5,4	2,6	2,11	0,83-5,36	0,115	2,8	3,2	0,87	0,19-3,97	~1,00
C	165	1,6	1,6	0,94	0,29-3,08	~1,00	0,7	1,7	0,40	0,05-3,27	0,688	2,7	1,6	1,77	0,29-10,7	0,668
C	168	3,1	4,4	0,70	0,31-1,57	0,450	3,4	5,0	0,66	0,24-1,79	0,497	2,7	2,3	1,17	0,23-5,91	~1,00
C	171	7,3	8,6	0,84	0,48-1,47	0,456	10,1	9,1	1,13	0,60-2,12	0,732	3,6	7,0	0,50	0,15-1,67	0,394
T	156	78,3	77,6	1,04	0,73-1,48	0,860	77,0	77,7	0,96	0,61-1,50	0,915	80,0	77,3	1,17	0,63-2,19	0,641
T	159	2,7	2,2	1,24	0,48-3,19	0,631	3,4	1,4	2,40	0,72-7,99	0,168	1,8	4,7	0,38	0,07-1,90	0,289
T	162	1,6	0,9	1,70	0,45-6,40	0,479	0,0	0,5	NA	NA	NA	3,6	2,3	1,57	0,34-7,18	0,703
T	168	0,0	0,4	0,42	0,02-8,81	~1,00	0,0	0,2	NA	NA	NA	0,0	0,0	---	---	---
Outros		1,1	0,9				0,0	1,8				2,8	1,6			

OR: Odds ratio; **IC:** Intervalo de Confiança, **P:** Probabilidade; **NA:** não analisado; **INT:** Posição 17 do intron 3; **MIC:** *CD28* (*CAA*)_n.

TABELA 12. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS DA POSIÇÕES 17 E -372 DO GENE *CD28*.

		Total					EU					AF				
		Pacientes n=127 %	Controles n=239 %	OR	IC 95%	P	Pacientes n=71 %	Controles n=185 %	OR	IC 95%	P	Pacientes n=56 %	Controles n=54 %	OR	IC 95%	P
-372	INT															
A	C	2,9	2,4	1,20	0,46-3,14	0,798	2,7	2,7	1,04	0,32-3,38	~1,00	2,9	0,0	6,94	0,35-135	0,253
A	T	30,5	32,4	0,92	0,67-1,28	0,665	32,5	32,1	1,01	0,67-1,53	~1,00	28,3	34,3	0,77	0,43-1,36	0,383
G	C	14,0	15,8	0,87	0,57-1,34	0,582	15,5	16,2	0,95	0,56-1,61	0,895	12,3	15,7	0,76	0,36-1,64	0,564
G	T	52,6	49,4	1,13	0,83-1,53	0,503	49,3	49,0	1,02	0,69-1,49	~1,00	56,5	50,0	1,29	0,76-2,19	0,416

OR: Odds ratio; IC: Intervalo de Confiança, P: Probabilidade; NA: não analisado; INT: Posição 17 do intron 3.

TABELA 13. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO AS FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS DA POSIÇÃO -372 E DO LOCO MICROSSATÉLITE *CD28* (*CAA*)_n DO GENE *CD28*.

		Total					EU					AF				
		Pacientes n=113 %	Controles n=236 %	OR	IC 95%	P	Pacientes n=66 %	Controles n=184 %	OR	IC 95%	P	Pacientes n=47 %	Controles n=52 %	OR	IC 95%	P
-372	MIC															
A	153	0,0	0,6	0,30	0,02-5,76	0,555	0,0	0,5	NA	NA	NA	0,0	0,9	NA	NA	NA
A	156	32,4	32,2	1,00	0,72-1,41	~1,00	34,8	33,1	1,08	0,71-1,64	0,754	29,8	30,8	0,95	0,52-1,75	~1,00
A	168	0,0	1,0	0,19	0,01-3,41	0,184	0,0	0,0	---	---	---	0,0	2,9	0,15	0,01-3,01	~1,00
A	171	0,4	0,7	0,69	0,07-6,72	~1,00	0,0	0,9	0,39	0,02-7,68	0,569	0,0	0,0	---	---	---
G	156	50,3	48,1	1,10	0,80-1,51	0,559	49,2	47,0	1,09	0,73-1,63	0,679	51,1	50,0	1,04	0,60-1,82	0,889
G	159	2,7	1,9	1,40	0,49-3,99	0,578	2,3	1,4	1,69	0,40-7,16	0,433	3,2	3,8	0,82	0,18-3,78	~1,00
G	162	1,8	0,8	2,11	0,52-8,51	0,286	0,0	0,5	NA	NA	NA	4,3	1,9	2,27	0,41-12,6	0,425
G	165	0,0	1,3	0,16	0,01-2,82	0,186	0,0	1,1	0,31	0,02-5,72	0,575	0,0	1,9	0,22	0,01-4,58	0,502
G	168	3,1	4,1	0,76	0,32-1,84	0,675	3,0	5,8	0,52	0,17-1,53	0,348	3,2	0,0	7,99	0,41-156	0,107
G	171	6,3	8,6	0,69	0,37-1,30	0,311	8,3	8,9	0,92	0,45-1,88	~1,00	4,3	7,7	0,53	0,16-1,83	0,377

OR: Odds ratio; IC: Intervalo de Confiança, P: Probabilidade; NA: não analisado; MIC: Posição do loco mirossatélite *CD28* (*CAA*)_n.

5.5 Análise individual do SNP -1722 (C,T) do gene *CTLA4*

Para esse SNP foram genotipados 111 pacientes e 188 indivíduos controles. Foram comparadas as frequências entre os grupos controle coletado especificamente para o projeto sobre pênfigo e controle do LGMH. Não houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,160$ para o grupo EU e $P\sim 1,000$ para o grupo AF).

Na comparação das frequências alélicas entre as amostras de pacientes EU e AF e controles EU e AF não houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,800$ para controles e $P=1,000$ para pacientes). Todos os grupos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 14).

As frequências alélicas, genóticas e de portadores são semelhantes entre pacientes e controles nos subgrupos EU e AF e na amostra total (Tabela 14). Portanto, os testes de associação destas variantes com o PFE não revelaram diferenças estatisticamente significantes.

5.6 Análise individual do SNP -1577 (A,G) do gene *CTLA4*

Foram genotipados 241 indivíduos-controle e 123 pacientes para o SNO -1577 (A, G).

Foram comparadas as frequências entre os grupos controle coletado especificamente para o projeto sobre pênfigo e controle do LGMH. Não houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,840$ para o grupo EU e $P=0,953$ para o grupo AF).

As frequências alélicas, genóticas e de indivíduos portadores das variantes foram comparadas entre pacientes EU e AF e controles EU e AF. Como as frequências de pacientes e controles não diferem estatisticamente ($p=0,503$ para controles e $p=0,795$ para pacientes), é possível reunir os dois grupos e obter a estimativa das frequências da população total. Os dados são mostrados na tabela 15.

Também para essa posição, as frequências são semelhantes entre pacientes e controles nos dois grupos e na amostra total. Portanto, testes de associação das variantes dessa posição com o PFE não mostram diferenças estatisticamente significantes.

TABELA 14. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DA POSIÇÃO -1722 (T,C) DO GENE *CTLA4*.

	Total					EU					AF				
Frequências	Pac n=111 %	Con n=188 %	OR	IC 95%	<i>P</i>	Pac n=64 %	Con n=150 %	OR	IC 95%	<i>P</i>	Pac n=47 %	Con n=38 %	OR	IC 95%	<i>P</i>
Alélicas															
<i>CTLA4 -1722 T</i>	93,7	93,4	1,06	0,54-2,08	~1,00	93,8	93,0	1,13	0,49-2,62	~1,00	93,6	94,7	0,81	0,22-3,00	~1,00
<i>CTLA4 -1722 C</i>	6,3	6,6	0,95	0,48-1,86		6,2	7,0	0,89	0,38-2,06		6,4	5,3	1,23	0,33-4,52	
Portadores															
<i>CTLA4 -1722 T</i>	100,0	100,0	0,59	0,01-30,0	~1,00	100,0	100,0	0,43	0,01-21,8	~1,00	100,0	100,0	1,23	0,02-63,6	~1,00
<i>CTLA4 -1722 C</i>	12,6	13,3	0,94	0,47-1,90	~1,00	12,5	14	0,88	0,37-2,10	0,83	12,8	10,5	1,24	0,32-4,77	~1,00
Genotípicas															
<i>T/T</i>	87,4	86,7	1,06	0,53-2,14	~1,00	87,5	86,0	1,14	0,48-2,73	0,83	87,2	89,5	0,80	0,21-3,08	~1,00
<i>T/C</i>	12,6	13,3	0,94	0,47-1,90	~1,00	12,5	14,0	0,88	0,37-2,10	0,83	12,8	10,5	1,24	0,32-4,77	~1,00
<i>C/C</i>	0,0	0,0	---	---	---	0,0	0,0	---	---	---	0,0	0,0	---	---	---
Equilíbrio H-W (<i>P</i>)	~1,00	~1,00				~1,00	~1,00				~1,00	~1,00			

Pac: Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds ratio; **IC:** Intervalo de Confiança, ***P*:** Probabilidade

TABELA 15. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DA POSIÇÃO -1577 (A,G) DO GENE *CTLA4*.

	Total					EU					AF				
Frequências	Pac n=123 %	Con n=241 %	OR	IC 95%	P	Pac n=67 %	Con n=186 %	OR	IC 95%	P	Pac n=56 %	Con n=55 %	OR	IC 95%	P
Alélicas															
CTLA4 -1577 G	63,4	61,6	1,08	0,79-1,48	0,68	64,2	60,8	1,16	0,77-1,74	0,53	62,5	64,5	0,92	0,53-1,58	0,77
CTLA4 -1577 A	36,6	38,4	0,93	0,67-1,27		35,8	39,2	0,86	0,57-1,30		37,5	35,5	1,09	0,63-1,89	
Portadores															
CTLA4 -1577 G	84,6	85,5	0,93	0,51-0,71	0,87	88,1	86,6	1,15	0,49-2,68	0,83	80,4	81,8	0,91	0,35-2,35	~1,00
CTLA4 -1577 A	57,7	62,2	0,83	0,53-1,29	0,41	59,7	65,1	0,80	0,45-1,41	0,46	55,4	52,7	1,11	0,53-2,35	0,85
Genotípicas															
G/G	42,3	37,8	1,21	0,78-1,88	0,43	40,3	34,9	1,26	0,71-2,23	0,47	44,6	47,3	0,90	0,43-1,90	0,85
A/G	42,3	47,7	0,80	0,52-1,24	0,39	47,8	51,6	0,86	0,49-1,50	0,68	35,7	34,5	1,05	0,48-2,30	~1,00
A/A	15,4	14,5	1,08	0,59-1,97	0,88	11,9	13,5	0,87	0,37-2,04	0,84	19,7	18,2	1,10	0,43-2,85	~1,00
Equilíbrio H-W (P)	0,332	~1,00				~1,00	0,297				0,089	0,077			

Pac: Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds ratio; **IC:** Intervalo de Confiança, ***P*:** Probabilidade

5.7 Análise individual do SNP +49 (A,G) do gene *CTLA4*

Essa posição variável já havia sido genotipada por PAVONI *et al.*, 2005. Na época, foram genotipados 132 pacientes e 165 indivíduos-controle. Quando comparadas às frequências alélicas e genotípicas, verificou-se um aumento de homozigotos A/A e uma diminuição dos heterozigotos A/G entre os pacientes, sendo essa última significativa estatisticamente. Entretanto, o valor de P estava próximo do limite de significância ($P=0,035$).

Neste trabalho, foram genotipados mais 84 pacientes e 76 indivíduos-controle. A amostra foi reanalisada. Com o aumento da amostra a associação encontrada com o genótipo A/G desapareceu.

Para essa posição também foram comparadas as frequências entre os grupos controle coletado para o projeto sobre pênfigo e controle do LGMH, tanto para a amostra EU, quanto para a amostra AF. Não houve diferença estatística ($P= 0,923$ para o grupo EU e $P= 0,065$ para o grupo AF).

Na comparação das frequências alélicas entre os grupos de paciente EU e AF e controles EU e AF não houve diferença estatisticamente significativa ($P= 0,505$ para controles e $P= 0,811$ para pacientes). Todos os grupos analisados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (tabela 16).

As frequências de portadores das variantes, bem como as frequências alélicas e genotípicas, observadas para esse SNP não evidenciam associação positiva ou negativa ao se fazer comparações entre o grupo de pacientes e o grupo controle da amostra total (tabela 16). O mesmo foi observado quando as subamostras de EU e AF foram analisadas separadamente.

TABELA 16. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DA POSIÇÃO +49 (A,G) DO GENE *CTLA4*.

	Total					EU					AF				
Frequências	Pac n=123 %	Con n=241 %	OR	IC 95%	P	Pac n=80 %	Con n=244 %	OR	IC 95%	P	Pac n=66 %	Con n=73 %	OR	IC 95%	P
Alélicas															
CTLA4 +49 A	60,3	65,5	0,80	0,60-1,07	0,141	59,4	66,2	1,38	0,90-2,13	0,12	61,4	63,0	0,88	0,54-1,44	0,804
CTLA4 +49 G	39,7	34,5	1,25	0,94-1,66		40,6	33,8	1,34	0,93-1,93		38,6	37,0	1,07	0,66-1,74	
Portadores															
CTLA4 +49 A	82,2	88,3	0,61	0,35-1,05	0,092	82,5	87,7	0,66	0,33-1,32	0,25	81,8	90,4	0,48	0,18-1,30	0,218
CTLA4 +49 G	61,6	57,4	1,19	0,80-1,78	0,406	63,8	55,3	1,42	0,84-2,39	0,18	59,1	64,4	0,80	0,40-1,59	0,602
Genotípicas															
A/A	38,4	42,6	0,84	0,56-1,25	0,436	36,6	44,7	0,70	0,42-1,19	0,19	40,9	35,6	1,25	0,63-2,48	0,598
A/G	43,8	45,7	0,93	0,62-1,37	0,760	46,3	43,0	1,14	0,69-1,89	0,69	40,9	54,8	0,57	0,29-1,12	0,136
G/G	17,8	11,7	1,64	0,95-2,83	0,091	17,5	12,3	1,51	0,76-3,02	0,27	18,2	9,6	2,10	0,77-5,69	0,216
Equilíbrio H-W (P)	0,297	0,903				0,816	0,562				0,293	0,200			

Pac: Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds ratio; **IC:** Intervalo de Confiança; **P:** Probabilidade.

5.8 Análise individual do SNP CT60, posição +6320 (A,G) do gene *CTLA4*

Para esta posição foram tipados 145 pacientes e 294 indivíduos-controle.

Assim como para os demais SNPs analisados, para este também foram analisadas separadamente a amostra de origem predominantemente européia (EU) e de origem predominantemente africana (AF), e foi realizado teste de homogeneidade para comparar as frequências da amostra controle coletada para o projeto sobre pênfigo com a amostra controle pertencente ao Painel do LGMH ($P= 0,921$ para o grupo EU e $P= 1,000$ para o grupo AF).

Diferenças estatisticamente significantes quando comparadas as frequências alélicas entre pacientes e controles das subamostras euro- e afro-brasileiros não foram encontradas ($p= 0,449$ para controles e $p= 0,902$ para pacientes). Todos os grupos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 17).

Foram comparadas as frequências alélicas, genótípicas e de portadores entre pacientes e indivíduos-controle dos dois grupos (EU e AF) e da amostra total. Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes somente para a amostra total (Tabela 17).

Os resultados encontrados apontam em direção à associação deste SNP com o pênfigo foliáceo endêmico. Há uma redução na frequência de portadores do alelo A e um excesso de homozigotos G/G entre os pacientes. Resultados semelhantes, mas não estatisticamente significantes, foram encontrados nas subamostras EU e AF.

Quando comparadas as frequências de portadores do alelo A na amostra total, vê-se uma associação negativa deste com o PFE. Quanto às frequências genótípicas, foi encontrada associação positiva com genótipo G/G e associação negativa com o genótipo A/G. Não foi encontrada qualquer associação, ou tendência à associação, do genótipo A/A com a doença.

TABELA 17. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E DE PORTADORES DAS VARIANTES DA POSIÇÃO +6320 (CT60/A,G) DO GENE *CTLA4*.

	Total					EU					AF				
Frequências	Pac n=145 %	Con n=289 %	OR	IC 95%	P	Pac n=83 %	Con n=225 %	OR	IC 95%	P	Pac n=62 %	Con n=64 %	OR	IC 95%	P
Alélicas															
CT60 A	38,3	42,9	0,83	0,62-1,10	0,227	38,6	44,0	0,80	0,56-1,15	0,236	37,9	39,0	0,95	0,57-1,58	0,896
CT60 G	61,7	57,1	1,21	0,91-1,62		61,4	56,0	1,25	0,87-1,80		62,1	61,0	1,05	0,63-1,74	
Portadores															
CT60 A	58,6	69,9	0,61	0,40-0,92	0,025	60,2	71,6	0,60	0,36-1,02	0,069	54,7	64,1	0,73	0,36-1,49	0,478
CT60 G	82,1	84,1	0,87	0,51-1,47	0,603	83,1	83,6	0,97	0,49-1,90	~1	80,6	85,9	0,68	0,26-1,75	0,476
Genotípicas															
A/A	17,9	15,9	1,15	0,68-1,96	0,596	16,9	16,5	1,03	0,53-2,02	~1	19,4	14,1	1,47	0,57-3,77	0,478
A/G	40,7	54,0	0,58	0,39-0,88	0,005	43,4	55,1	0,62	0,38-1,04	0,065	37,1	50,0	0,59	0,29-1,20	0,155
G/G	41,4	30,1	1,64	1,08-2,48	0,019	39,7	28,4	1,66	0,98-2,81	0,072	43,5	35,9	1,38	0,67-2,81	0,469
Equilíbrio H-W (P)	0,110	0,101				0,477	0,107				0,105	0,797			

Pac: Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds ratio; **IC:** Intervalo de Confiança, **P:** Probabilidade

5.9 Análise individual do microssatélite CTLA4 (TA)_n

Para esse loco, foram analisados 253 indivíduos controles e 104 pacientes.

Foram encontrados 23 alelos na amostra populacional estudada, sendo eles: *86, *92, *94, *96, *98, *100, *102, *104, *106, *108, *110, *112, *114, *116, *118, *120, *122, *124, *126, *128, *130, *132, *134.

Foram comparadas as frequências alélicas entre os grupos controle coletado para o projeto sobre pênfigo e controle do LGMH ($P=0,160$ para o grupo EU e $P\sim 1,000$ para o grupo AF).

Na comparação das frequências alélicas entre os grupos EU e AF, houve diferença estatística quando comparadas as frequências nos pacientes ($P=0,008$). Por isso, optou-se pelo não agrupamento destes grupos em uma amostra total. Tanto o grupo de pacientes quanto o de controles estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 18).

Nas tabelas 18 e 19 são mostradas as frequências alélicas e de portadores dos alelos para esse microssatélite, respectivamente. A tabela 20 mostra a comparação das frequências genóticas para os genótipos de maior frequência.

Diferenças estatisticamente significativas entre pacientes e indivíduos-controle são encontradas para o alelo *100 (OR= 8,42 na amostra AF) e portadores desse alelo (OR= 9,05 na AF). Deve se levar em conta que as associações encontradas para esse alelo podem ser espúrias devidas à baixa frequência do alelo aliada ao pequeno tamanho da amostra populacional. Também foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre pacientes e indivíduos-controle EU para frequências alélicas e de portadores do alelo *104 (OR=1,91).

Para este loco, a interpretação do padrão de picos para genotipagem das amostras se mostrou mais subjetivo que os demais (veja discussão).

TABELA 18. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE CTLA4 (TA)_n.

Alelos	EU					AF				
	Pac n=56 %	Con n=199 %	OR	IC 95%	P	Pac n=54 %	Con n=48 %	OR	IC 95%	P
*86	42,0	49,0	0,75	0,49-1,15	0,188	37,5	36,1	1,06	0,60-1,88	0,880
*92	2,7	0,5	5,45	0,90-33,0	0,074	1,0	1,9	0,56	0,05-6,25	~1,00
*94	0,8	2,3	0,39	0,05-3,11	0,703	2,1	0,9	2,28	0,20-25,5	0,602
*96	0,0	0,0	---	---	---	0,0	0,9	NA	NA	NA
*98	1,8	0,7	2,39	0,40-14,5	0,305	2,1	2,8	0,74	0,12-4,55	~1,00
*100	0,0	0,0	---	---	---	7,3	0,9	8,42	1,02-69,7	0,027
*102	0,9	1,5	0,71	0,08-6,12	~1,00	1,0	2,8	0,37	0,04-3,60	0,625
*104	26,8	16,1	1,91	1,16-3,14	0,011	14,6	21,3	0,63	0,30-1,31	0,279
*106	4,5	6,5	0,67	0,25-1,78	0,511	10,4	9,3	1,14	0,45-2,87	0,820
*108	2,7	4,0	0,66	0,19-2,30	0,776	8,3	8,3	1,00	0,37-2,70	~1,00
*110	2,7	2,5	1,07	0,29-3,95	~1,00	3,1	18,5	1,71	0,28-10,5	0,665
*112	2,7	2,8	0,97	0,27-3,53	~1,00	2,1	0,9	2,28	0,20-25,5	0,598
*114	0,9	1,3	0,71	0,08-6,12	~1,00	0,0	0,0	---	---	---
*116	1,8	2,0	0,89	0,19-4,23	~1,00	1,0	2,8	0,56	0,05-6,25	~1,00
*118	2,7	0,2	3,58	0,22-57,6	0,392	2,1	2,8	0,74	0,12-4,55	~1,00
*120	0,0	2,3	0,18	0,01-3,16	0,212	1,0	0,9	1,13	0,07-18,3	~1,00
*122	2,7	2,0	1,34	0,35-5,14	0,714	1,0	0,9	1,13	0,07-18,3	~1,00
*124	0,9	2,0	0,44	0,05-3,55	0,692	3,1	2,8	0,74	0,12-4,55	~1,00
*126	1,8	1,5	1,43	0,27-7,47	0,652	1,0	0,9	1,13	0,07-18,3	~1,00
*128	1,8	1,3	0,71	0,08-6,12	~1,00	1,0	0,0	NA	NA	NA
*130	0,0	0,5	NA	NA	NA	0,0	0,9	NA	NA	NA
*132	0,0	0,7	0,50	0,03-9,80	1,000	0,0	0,0	---	---	---
*134	0,0	0,2	NA	NA	NA	0,0	0,0	---	---	---
Equilíbrio H-W (P)	0,854	0,729			0,161	0,459				

Pac: Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds ratio; **IC:** Intervalo de Confiança;

P: Probabilidade; **NA:** Não analisado.

TABELA 19. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE *CTLA4 (TA)n*.

Portadores	EU					AF				
	Pac n=56 %	Con n=199 %	OR	IC 95%	P	Pac n=48 %	Con n=54 %	OR	IC 95%	P
*86	67,9	76,4	0,65	0,34-1,25	0,225	56,3	57,4	0,95	0,44-2,09	~1,00
*92	5,4	1,0	5,58	0,91-34,2	0,073	2,1	3,7	0,55	0,05-6,30	~1,00
*94	1,8	4,5	0,38	0,05-3,10	0,699	4,2	1,9	2,30	0,20-26,3	0,598
*96	0,0	0,0	---	---	---	0,0	1,9	NA	NA	NA
*98	3,6	1,5	2,42	0,39-14,8	0,306	4,2	5,6	0,74	0,12-4,62	~1,00
*100	0,0	0,0	---	---	---	14,6	1,9	9,05	1,07-76,5	0,025
*102	1,8	2,5	0,71	0,08-6,17	~1,00	2,1	5,6	0,36	0,04-3,60	0,622
*104	48,2	30,7	2,11	1,15-3,86	0,021	27,1	37,0	0,54	0,23-1,24	0,198
*106	8,9	12,1	0,71	0,26-1,97	0,640	20,8	16,7	1,32	0,48-3,57	0,618
*108	5,4	8,0	0,65	0,18-2,31	0,777	16,7	16,7	1,00	0,35-2,84	~1,00
*110	5,4	5,0	1,07	0,28-4,03	~1,00	2,1	3,7	0,55	0,05-6,30	~1,00
*112	5,4	5,0	1,07	0,28-4,03	~1,00	4,2	1,9	2,30	0,20-26,3	0,601
*114	1,8	2,0	0,89	0,10-8,09	~1,00	0,0	0,0	---	---	---
*116	1,8	4,0	0,43	0,05-3,55	0,686	2,1	3,7	0,55	0,05-6,30	~1,00
*118	1,8	0,5	3,60	0,22-58,5	0,399	4,2	5,6	0,74	0,12-4,62	~1,00
*120	0,0	4,5	0,18	0,01-3,10	0,216	2,1	1,9	1,13	0,07-18,5	~1,00
*122	5,4	4,0	1,35	0,35-5,27	0,706	2,1	1,9	1,13	0,07-18,5	~1,00
*124	1,8	4,0	0,43	0,05-3,55	0,688	6,3	5,6	1,13	0,22-5,90	~1,00
*126	3,6	2,5	1,44	0,27-7,61	0,656	0,0	0,0	---	---	---
*128	3,6	2,5	1,44	0,27-7,61	0,652	2,1	0,0	---	---	0,471
*130	0,0	1,0	NA	NA	NA	0,0	1,9	NA	NA	NA
*132	0,0	1,5	0,50	0,03-9,76	~1,00	0,0	0,0	---	---	---
*134	0,0	0,5	NA	NA	NA	0,0	0,0	---	---	---

Pac: Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds ratio; **IC:** Intervalo de Confiança;

P: Probabilidade; **NA:** Não analisado.

TABELA 20. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE *CTLA4 (TA)_n*.

Genótipos	EU					AF				
	Pac n=56 %	Con n=199 %	OR	IC 95%	P	Pac n=48 %	Con n=54 %	OR	IC 95%	P
86/86	16,1	21,6	0,69	0,32-1,53	0,441	16,7	14,8	1,15	0,40-3,34	~1,00
86/94	0,0	2,0	0,38	0,02-7,25	0,580	2,1	1,9	1,13	0,07-18,5	~1,00
86/104	21,4	17,6	1,28	0,61-2,67	0,558	10,4	16,7	0,58	0,18-1,87	0,405
86/106	3,6	5,0	0,70	0,15-3,29	~1,00	8,3	5,6	1,55	0,33-7,28	0,700
86/108	0,0	5,5	0,15	0,01-2,50	0,127	4,2	5,6	0,74	0,12-4,62	~1,00
86/120	0,0	3,5	0,23	0,01-4,04	0,353	0,0	1,9	NA	NA	NA
104/104	5,6	1,5	3,50	0,69-17,8	0,114	2,1	5,6	0,36	0,04-3,60	0,617
104/106	3,6	2,5	1,44	0,27-7,61	0,651	2,1	7,4	0,27	0,03-2,47	0,368
Outros	55,3	42,3	---	---	---	56,2	46,1	---	---	---

Pac: Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds ratio; **IC:** Intervalo de Confiança, **P:** Probabilidade; **NA:** Não analisado.

5.10 Análise individual do microssatélite *D2S72 (CA)_n*

Para esse loco, foram analisados 306 indivíduos-controle e 139 pacientes.

Foram encontrados 13 alelos na população total estudada, sendo eles: *149, *151, *155, *157, *159, *161, *163, *165, *167, *169, *171, *173 e *175. As frequências alélicas encontradas nos grupos EU, AF e amostra total são mostradas na tabela 21. As tabelas 22 e 23 mostram as frequências de portadores dos alelos e frequências genotípicas.

Foram comparadas as frequências entre os grupos controle de pênfigo e do LGMH ($P=0,075$ para o grupo EU e $P=0,608$ para o grupo AF).

Na comparação das frequências alélicas entre as subamostras EU e AF nos grupos pacientes e controles, também não houve diferença estatística ($P=0,076$ para controles e $P=0,849$ para pacientes). Todos os grupos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 21).

Diferenças estatisticamente significativas entre pacientes e indivíduos-controle são encontradas para o alelo *167 (OR= 1,48 e na amostra total e 1,45 na amostra EU) e portadores desse alelo (OR= 1,71 na EU). Também foi associação positiva para o genótipo 167/167 nos dois grupos populacionais analisados, assim como na amostra total (OR= 2,04 para EU; 2,70 para AF e 2,30 para a amostra total).

TABELA 21. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE *D2S72 (CA)_n*.

Alelos	Total					EU					AF				
	Pac n=139 %	Con n=306 %	OR	IC 95%	P	Pac n=78 %	Con n=234 %	OR	IC 95%	P	Pac n=61 %	Con n=72 %	OR	IC 95%	P
<i>*149</i>	0,0	0,2	NA	NA	NA	0,0	0,0	NA	NA	NA	0,0	0,7	NA	NA	NA
<i>*151</i>	0,0	0,2	NA	NA	NA	0,0	0,0	NA	NA	NA	0,0	0,7	NA	NA	NA
<i>*155</i>	0,0	0,5	0,31	0,02-6,07	0,557	0,0	0,2	NA	NA	NA	0,0	1,4	NA	NA	NA
<i>*157</i>	0,4	0,2	NA	NA	NA	0,0	0,2	NA	NA	NA	0,8	0,0	NA	NA	NA
<i>*159</i>	2,2	1,0	2,23	0,71-6,97	0,201	1,9	0,9	2,27	0,50-10,3	0,372	2,5	1,4	1,79	0,29-10,9	0,667
<i>*161</i>	4,3	4,2	1,02	0,51-2,05	~1,00	3,8	4,1	0,78	0,29-2,13	0,812	5,0	4,9	0,84	0,26-2,71	~1,00
<i>*163</i>	18,0	20,7	0,84	0,58-1,20	0,397	19,9	22,2	0,87	0,55-1,36	0,572	15,6	16,0	0,91	0,47-1,78	0,862
<i>*165</i>	14,7	17,5	0,82	0,55-1,21	0,330	14,7	19,0	0,71	0,43-1,16	0,202	14,8	12,5	1,21	0,60-2,45	0,597
<i>*167</i>	47,1	37,6	1,48	1,11-1,97	0,011	44,9	35,9	1,45	1,01-2,10	0,048	50,0	43,1	1,32	0,81-2,15	0,272
<i>*169</i>	4,0	4,9	0,80	0,39-1,62	0,609	3,8	4,5	0,85	0,34-2,15	0,821	4,1	6,3	0,64	0,21-1,97	0,583
<i>*171</i>	8,0	10,3	0,75	0,45-1,24	0,334	9,6	10,0	0,95	0,52-1,76	~1,00	5,7	11,1	0,49	0,19-1,23	0,136
<i>*173</i>	1,1	2,1	0,50	0,14-1,78	0,421	0,6	2,1	1,00	0,10-9,68	~1,00	1,6	2,1	0,78	0,13-4,77	~1,00
<i>*175</i>	0,4	0,6	0,55	0,06-4,93	~1,00	0,6	0,9	0,75	0,08-6,75	~1,00	0,0	0,0	NA	NA	NA
Equilíbrio H-W (P)	0,556	0,869			0,701	0,573					0,301	0,510			

Pac: Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds ratio; **IC:** Intervalo de Confiança, **P:** Probabilidade, **NA:** não analisado.

TABELA 22. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES DAS VARIANTES ALÉLICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE *D2S72 (CA)_n*.

Portadores	Total					EU					AF				
	Pac n=139 %	Con n=306 %	OR	IC 95%	P	Pac n=78 %	Con n=234 %	OR	IC 95%	P	Pac n=61 %	Con n=72 %	OR	IC 95%	P
<i>*149</i>	0,0	0,3	NA	NA	NA	0,0	0,0	NA	NA	NA	0,0	0,7	NA	NA	NA
<i>*151</i>	0,0	0,3	NA	NA	NA	0,0	0,0	NA	NA	NA	0,0	0,7	NA	NA	NA
<i>*155</i>	0,0	1,0	0,31	0,02-6,06	0,554	0,0	0,4	NA	NA	NA	0,0	1,4	NA	NA	NA
<i>*157</i>	0,7	0,3	NA	NA	NA	0,0	0,4	NA	NA	NA	0,8	0,0	NA	NA	NA
<i>*159</i>	4,3	2,0	2,26	0,71-7,12	0,213	3,8	1,7	2,30	0,50-10,5	0,378	2,5	1,4	1,81	0,29-11,2	0,659
<i>*161</i>	6,5	7,8	0,81	0,37-1,80	0,693	7,7	6,8	1,14	0,43-3,01	0,802	9,8	9,7	1,01	0,32-3,19	~1,00
<i>*163</i>	33,1	37,3	0,83	0,55-1,27	0,467	35,9	37,2	0,95	0,56-1,61	0,892	29,5	30,6	0,95	0,45-2,00	~1,00
<i>*165</i>	26,6	30,1	0,84	0,54-1,32	0,492	28,2	32,9	0,80	0,46-1,41	0,486	24,6	20,8	1,24	0,55-2,80	0,684
<i>*167</i>	69,1	62,4	1,34	0,88-2,06	0,214	66,7	53,8	1,71	1,00-2,93	0,042	72,1	73,6	0,93	0,43-2,00	0,841
<i>*169</i>	7,9	9,2	0,85	0,41-1,77	0,727	7,7	8,1	0,94	0,36-2,45	~1,00	8,2	12,5	0,63	0,20-1,98	0,577
<i>*171</i>	15,1	20,3	0,70	0,41-1,20	0,243	17,9	19,7	0,89	0,46-1,73	0,872	11,5	20,8	0,49	0,19-1,30	0,169
<i>*173</i>	2,2	4,2	0,50	0,14-1,77	0,422	1,3	4,3	0,28	0,03-2,21	0,300	1,6	2,1	0,78	0,13-4,82	~1,00
<i>*175</i>	0,7	1,3	0,55	0,06-4,94	~1,00	1,3	1,7	0,75	0,08-6,78	~1,00	0,0	0,0	NA	NA	NA

Pac: Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds ratio; **IC:** Intervalo de Confiança, **P:** Probabilidade, **NA:** não analisado.

TABELA 23. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO LOCO MICROSSATÉLITE *D2S72 (CA)_n*.

Genótipos	Total					EU					AF				
	Pac n=139 %	Con n=306 %	OR	IC 95%	P	Pac n=78 %	Con n=234 %	OR	IC 95%	P	Pac n=61 %	Con n=72 %	OR	IC 95%	P
167/171	7,2	9,2	0,77	0,36-1,63	0,581	6,4	8,5	0,73	0,27-2,02	0,631	8,2	11,1	0,71	0,22-2,31	0,771
171/169	0,0	2,0	0,17	0,01-2,96	0,183	0,0	1,3	0,42	0,02-8,25	0,576	0,0	4,2	0,16	0,01-3,19	0,250
171/165	2,9	3,3	0,88	0,27-2,85	1,000	5,1	3,8	1,35	0,40-4,52	0,744	0,0	1,4	NA	NA	NA
167/165	7,9	11,1	0,69	0,34-1,40	0,393	7,7	11,5	0,64	0,25-1,61	0,406	8,2	9,7	0,83	0,25-2,76	1,000
167/161	2,9	4,6	0,62	0,20-1,91	0,602	6,4	5,1	1,27	0,43-3,72	0,776	1,6	2,8	NA	NA	NA
167/169	5,8	3,3	1,81	0,70-4,68	0,311	6,4	2,1	3,14	0,88-11,1	0,132	4,9	6,9	0,69	0,16-3,03	0,727
167/167	25,2	12,7	2,30	1,38-3,83	0,002	23,1	12,8	2,04	1,06-3,91	0,042	27,9	12,5	2,70	1,11-6,62	0,029
165/165	2,9	4,9	0,57	0,19-1,76	0,452	1,3	5,1	0,24	0,03-1,88	0,198	4,9	4,2	1,19	0,23-6,12	~1,00
167/163	15,8	16,3	0,96	0,56-1,66	1,000	15,4	15,0	1,03	0,51-2,11	1,000	16,4	20,8	0,75	0,31-1,81	0,660
171/163	2,2	4,6	0,46	0,13-1,63	0,300	2,6	5,6	0,45	0,10-2,03	0,374	1,6	1,4	NA	NA	NA
163/163	2,9	4,2	0,67	0,21-2,09	0,596	3,8	5,1	0,74	0,20-2,69	0,771	1,6	1,4	NA	NA	NA
163/165	7,9	7,2	1,11	0,52-2,36	0,846	11,5	8,5	1,36	0,59-3,11	0,493	3,3	2,8	NA	NA	NA
163/169	0,7	1,6	0,44	0,05-3,77	0,669	1,3	2,1	0,59	0,07-5,17	1,000	0,0	0,0	---	---	---
167/173	2,2	2,0	1,10	0,27-4,48	1,000	1,3	1,3	1,00	0,10-9,76	~1,00	3,4	4,2	0,78	0,13-4,82	~1,00

Pac: Pacientes; **Con:** Controles; **OR:** Odds ratio; **IC:** Intervalo de Confiança, **P:** Probabilidade.

5.11 Análise dos haplótipos do gene *CTLA4* e do marcador D2S72

Foram comparadas todas as combinações haplotípicas possíveis para as quatro posições analisadas para o gene *CTLA4* e o marcador D2S72 entre pacientes e indivíduos-controle (dados não mostrados).

Analisando os haplótipos desses cinco sítios, combinados dois a dois e três a três (dados não mostrados), foram encontradas associações com os haplótipos:

- *D2S72*167_CTLA4*104* na amostra EU (OR = 1,99; IC = 1,17-3,41; $P = 0,014$);
- *CT60*G_D2S72*167* na amostra total (OR = 1,46; IC = 1,07-1,99; $P = 0,016$);
- *CT60*G_D2S72*167_CTLA4*104* na amostra total (OR = 1,99; IC = 1,17-3,41; $P = 0,041$);

Nas tabelas 24 e 25 estão as comparações das frequências entre pacientes e indivíduos controles para os haplótipos mais frequentes de 4 posições: CT60, -1577, +49, CTLA (TA)_n e D2S72.

TABELA 24. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS DAS POSIÇÕES CT60, -1577, -1722, +49 E LOCO MICROSSATÉLITE *CTLA4 (TA)_n* PARA A AMOSTRA EURO-BRASILEIRA.

HAPLÓTIPOS					EU				
CT60	-1577	D2S72	+49	CTLA4 MIC	Pacientes n=32 %	Controles n=60 %	OR	IC 95%	P
<i>A</i>	<i>A</i>	161	<i>A</i>	86	0,0	2,5	0,26	0,01-5,12	0,553
<i>A</i>	<i>A</i>	163	<i>A</i>	86	20,3	12,5	1,78	0,79-4,03	0,194
<i>A</i>	<i>A</i>	165	<i>A</i>	86	9,4	14,2	0,63	0,23-1,68	0,488
<i>A</i>	<i>A</i>	171	<i>A</i>	86	0,0	1,7	NA	NA	NA
<i>A</i>	<i>G</i>	165	<i>A</i>	86	0,0	3,3	0,20	0,01-3,79	0,301
<i>A</i>	<i>G</i>	167	<i>A</i>	86	0,0	4,2	0,16	0,01-2,99	0,161
<i>G</i>	<i>G</i>	165	<i>A</i>	98	0,0	1,7	NA	NA	NA
<i>G</i>	<i>G</i>	167	<i>A</i>	112	3,1	1,7	NA	NA	NA
<i>G</i>	<i>G</i>	167	<i>G</i>	104	25,0	17,5	1,20	0,56-2,59	0,698
<i>G</i>	<i>G</i>	167	<i>G</i>	106	6,3	7,5	0,82	0,24-2,78	1,000
<i>G</i>	<i>G</i>	167	<i>G</i>	108	3,2	3,3	0,94	0,17-5,25	1,000
<i>G</i>	<i>G</i>	167	<i>G</i>	112	0,0	1,7	NA	NA	NA
<i>G</i>	<i>G</i>	169	<i>A</i>	94	0,0	1,7	NA	NA	NA
<i>G</i>	<i>G</i>	171	<i>A</i>	124	0,0	1,7	NA	NA	NA
<i>G</i>	<i>G</i>	175	<i>A</i>	120	0,0	1,7	NA	NA	NA

OR: Odds ratio; **IC:** Intervalo de Confiança, **P:** Probabilidade.

TABELA 25. COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PACIENTES E CONTROLES QUANTO ÀS FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS DAS POSIÇÕES CT60, -1577, -1722, +49 E LOCO MICROSSATÉLITE *CTLA4* (TA)_n PARA A AMOSTRA AFRO-BRASILEIRA.

HAPLÓTIPOS					AF				
CT60	-1577	D2S72	+49	CTLA4 MIC	Pacientes n=34 %	Controles n=29 %	OR	IC 95%	P
A	A	161	A	86	0,0	3,4	NA	NA	NA
A	A	163	A	86	13,2	10,3	1,22	0,36-4,06	0,786
A	A	165	A	86	10,3	8,6	1,22	0,36-4,06	1,000
A	A	167	A	86	5,9	0,0	8,16	0,43-154	0,119
A	A	169	A	86	0,0	5,2	0,12	0,01-2,29	0,095
A	G	165	A	86	0,0	1,7	NA	NA	NA
G	G	167	A	102	0,0	3,4	NA	NA	NA
G	G	167	G	104	16,2	22,4	0,67	0,27-1,63	0,493
G	G	167	G	106	11,8	3,4	3,73	0,76-18,34	0,104
G	G	167	G	108	8,8	6,9	1,31	0,35-4,87	0,752
G	G	167	G	112	0,0	1,7	NA	NA	NA
G	G	167	G	116	0,0	3,4	NA	NA	NA

OR: Odds ratio; **IC:** Intervalo de Confiança, **P:** Probabilidade.

6 DISCUSSÃO

6.1 Considerações sobre a composição da amostra

Conclusões indevidas podem resultar da comparação de amostras de pacientes e indivíduos-controle escolhidos inadequadamente. Frequentemente são registradas associações entre polimorfismos e determinada doença complexa, que não são confirmadas em outros estudos (WILLET et al., 2002). Isso é devido principalmente à composição étnica dos grupos estudados. As diferenças nas frequências alélicas entre grupos étnicos distintos podem influenciar ou alterar os resultados e conclusões de estudos de associação, pois:

- 1) A frequência do alelo associado num grupo pode estar numa frequência muito baixa, ou mesmo, ausente em outros grupos étnicos;
- 2) A associação com a mesma variante pode estar presente em vários grupos, mas a contribuição relativa e impacto podem variar, ou seja, o risco relativo conferido pelo alelo difere entre os grupos (PETZL-ERLER, 1999).

Neste trabalho tentou-se minimizar esses efeitos dividindo a amostra de acordo com a composição étnica. A amostra foi dividida em dois subgrupos: um com indivíduos de origem predominantemente européia e o outro composto por indivíduos de origem predominantemente africana.

Em estudos de associação, podem ocorrer associações espúrias se esse subgrupos diferirem quanto às frequências alélicas do gene ou do marcador analisados e se não estiverem representados igualmente nas amostras de pacientes e indivíduos-controle. Por esse motivo, no presente trabalho, foi analisado, para cada uma das posições estudadas, cada subgrupo populacional separadamente e, somente quando não havia diferenças estatísticas significantes das frequências alélicas entre EU e AF, as subamostras foram reunidas formando a amostra total de pacientes e de controles.

6.2 Considerações sobre a qualidade das genotipagens

Outro fator que pode levar a associações não verdadeiras é a qualidade dos dados gerados. Isso é de grande importância e está intimamente relacionado com a técnica utilizada.

Neste trabalho, foram utilizados os métodos para genotipagem de SNPs que incluem PCR-RFLP, PCR-SSOP e PCR-ASO. Para a genotipagem dos microssatélites foi utilizada amplificação por PCR com oligonucleotídeos marcados com fluorescência seguida de eletroforese capilar em aparelho seqüenciador (Amersham GE) e um programa que permite a identificação do genótipo de cada indivíduo por picos de fluorescência.

Apesar de serem métodos muito bem estabelecidos e de alta confiabilidade, erros inerentes às técnicas e ao observador podem ocorrer, tais como: digestão parcial por uma enzima de restrição e erros de leitura ou de interpretação ou mesmo erros no momento de passar os dados para as planilhas ou bancos de dados.

Para tentar minimizar tais erros e ter o máximo de confiança nos dados gerados, alguns cuidados são tomados no LGMH:

- 1) Para análises com enzima de restrição, prefere-se optar por enzimas que apresentem, além do sítio de restrição que contenha a posição variável, um sítio de restrição monomórfico para o produto do segmento amplificado. Isto permite verificar de antemão possíveis falhas da enzima e a ocorrência de digestão parcial.
- 2) Quando não se encontra uma enzima de restrição com este padrão, toma-se o cuidado de a cada digestão realizada, incluir indivíduos com os três genótipos já conhecidos.
- 3) São realizadas genotipagem de dez controles “cegos”, juntamente com a amostra de pacientes e controles. Para todas as posições estudadas neste trabalho os resultados foram concordantes (com exceção do loco microssatélite do gene *CTLA4*). A discussão sobre os resultados obtidos para esse loco encontra-se adiante.
- 4) Antes dos dados serem definitivamente incluídos no banco de dados, é realizada uma segunda leitura dos genótipos. Isso permite verificar se houve erro na atribuição dos genótipos ou nos registros dos dados nas planilhas do banco de dados.

Diante dos fatos expostos acima, é improvável que qualquer resultado obtido na análise de associação seja devido a erros de genotipagem das amostras analisadas.

6.3 Considerações sobre a análise estatística

Em estudos de associação é comum corrigir o valor de P obtido, quando inferior a 0,05, pela fórmula $P_c = P.n$, onde P_c é o valor de P corrigido e n é o número de comparações

independentes efetuadas (correção de Bonferroni). O intuito dessa correção é prevenir erros estatísticos do tipo I (SVEJGAARD e RYDER, 1994).

Neste trabalho, optou-se pela não correção de do valor de P . O motivo pelo qual não foi adotado tal critério é devido ao fato de que os efeitos dos genótipos/alelos de susceptibilidade/resistência são pequenos (baixa penetrância) e, em consequência, os valores de P são bem altos, se a amostra populacional não for bem grande. O que pode nos levar a perder informações importantes caso a amostra analisada não seja suficientemente grande.

Esta correção também não é realizada quando a mesma associação é relatada em estudo prévio. Apesar de não haverem estudos dos SNPs analisados neste trabalho com PF endêmico, estudos de associação anteriores já relataram associações com o SNP CT60 e o microssatélite CTLA4 (TA)_n com outras doenças auto-imunes.

É importante ressaltar que, não adotando tal critério, as associações encontradas nesse trabalho podem ser decorrentes de erro estatístico do tipo I, com exceção da associação positiva com o genótipo 167/167 do marcador D2S72, a qual se mantêm mesmo após correção do valor de P . A interpretação dos resultados deste trabalho leva em conta todos esses detalhes e foi usado de bom senso e espírito crítico na interpretação dos mesmos.

6.4 Considerações sobre as análises do gene *CD28*

Os resultados para os SNPs -372 e +17 não mostram qualquer associação de suas variantes com o PFE.

O SNP -372 foi recentemente identificado e apontado por TEUSCH *et al.* (2004) como excelente candidato à associação com doenças auto-imunes, uma vez que a variante A cria um sítio de ligação para uma proteína acentuadora, que poderia estar envolvida na regulação transcricional deste gene. A ausência de associação deste SNP, quando analisado individualmente, com o pênfigo foliáceo endêmico, levando-nos a sugerir que este não influencia a susceptibilidade ou resistência a esta doença em nossa população. Da mesma forma, o SNP +17, relacionado com um possível sítio de recomposição, não está associado ao PF, também sugerindo que este não contribui para a patogênese da doença.

Através da análise do grupo controle, foi possível descrever a frequência dos alelos dessas posições na população brasileira. Em afro-brasileiros: 65,7% e 34,3%; em euro-brasileiros: 65,3% e 34,7% para CD28 -372*G e CD28 -372*A, respectivamente (Tabela 5). As

freqüências alélicas para este SNP encontradas neste trabalho para o grupo EU se assemelham às descritas por TEUSCH *et al.*, (2004), cuja amostra é de origem européia (67% para o alelo G e 33% para o alelo A).

Para o SNP +17, GUZMAN *et al.* (2005) estudaram a população do sudeste do Brasil e encontraram as seguintes freqüências alélicas: 73% para o alelo T e 27% para o alelo C, em uma população de origem predominantemente portuguesa, espanhola e italiana; 85% e 15% para os alelos T e C, respectivamente, para uma população de origem predominantemente do oeste do continente africano. As freqüências encontradas para esse SNP nos subgrupos estudados nesse trabalho assemelham-se às acima relatadas (80% e 20% para a amostra EU; 86,2 e 13,8 para a amostra AF).

Para o microssatélite CD28 (CAA)_n, a diferença de freqüência entre os grupos pacientes e controles encontrada para o alelo *159 provavelmente não está revelando uma associação verdadeira, devido à baixa freqüência desse alelo e ao tamanho amostral relativamente pequeno. Sendo assim, a ausência de associações convincentes nos permite concluir que esta repetição na região 3' UTR do gene *CD28* e/ou marcadores localizados próximos a ele não exercem influência, ou têm efeito reduzido, na patogênese do PFE.

Não foi possível comparar as freqüências alélicas encontradas para esse loco com as existentes em outras populações por falta de dados na literatura. Este trabalho é o primeiro a estudar essa posição na população brasileira e em pacientes com PFE.

Pela análise das freqüências dos haplótipos constituídos por estes três sítios polimórficos, foram verificadas associações fracas com o haplótipo A_C_165 na amostra total e com A_C_156 e G_C_168 na amostra EU. Concluímos que provavelmente são espúrias devido à baixa freqüência desses haplótipos e ao tamanho relativamente pequeno das amostras.

6.5 Considerações sobre as análises individuais das posições -1722, -1577 e +49 do gene *CTLA4*

Variantes polimórficas das posições -1722, -1577 e +49 foram investigadas nos dois subgrupos analisados neste trabalho e também na amostra total. Os resultados não demonstram qualquer associação entre variantes desses SNPs e PF, tanto na amostra total, quanto nas subamostras EU e AF. A ausência de associações entre essas variantes e o PFE indica que estas provavelmente não constituem fatores de risco e/ou proteção nesta população brasileira.

Também não foram encontradas associações com qualquer um dos haplótipos analisados. Foi analisado cada um dos SNPs com todas as outras posições analisadas neste trabalho. Foram feitas combinações 2 a 2, dos três juntos e das posições -1577 e +49 de *CTLA4* mais o marcador D2S72. A posição -1722 não foi incluída nessa última análise devido ao fato da amostra analisada para essa posição ser relativamente menor que as demais, o que aumenta o erro de estimativa de frequências haplotípicas e também por estar em desequilíbrio absoluto com a posição -1577 (dados não mostrados). Para todas as combinações haplotípicas possíveis analisadas não foram encontradas associações com PF.

Não foi possível comparar as frequências alélicas obtidas neste trabalho para as posições -1722 e -1577 com as de outras populações por falta de dados na literatura.

As frequências alélicas obtidas para a posição +49 são semelhantes às encontradas por GUZMAN *et al.* (2005), que relatam frequências alélicas de 70% para o alelo A e 30% para o alelo G, na população branca e de 68% e 32% para os alelos A e G, respectivamente, para uma população de origem predominante africana. As frequências encontradas para esse SNP nesse trabalho são: 66,2% e 33,8% para a amostra EU; 63 e 37% para a amostra AF.

6.6 Considerações sobre a análise individual da posição +6320 (CT60) do gene *CTLA4*

UEDA *et al.* (2003) encontraram o SNP CT60 associado com várias doenças auto-imunes e propuseram um mecanismo pelo qual variantes desta posição estariam relacionadas com diferenças na eficiência da recomposição do RNAm de *CTLA4* e um aumento da produção da forma solúvel desta proteína.

Os resultados deste trabalho apontam em direção à associação deste SNP com o pênfigo foliáceo endêmico, quando analisada a amostra total.

A frequência de portadores do alelo A no grupo de pacientes (genótipos A/A e A/G) está significativamente diminuída na amostra total, entretanto, esse resultado é totalmente devido à redução da frequência de heterozigotos A/G. Por outro lado, observamos um aumento significativo de homozigotos G/G entre os pacientes. Não foi encontrada qualquer associação, ou tendência à associação, do genótipo A/A com a doença. UEDA *et al.* (2003) encontraram associação negativa com o alelo A e com o genótipo A/A e associação positiva com o genótipo G/G.

Apesar do trabalho de UEDA *et al.* (2003) ter grande impacto e ser referência para muitos estudos de associação, uma vez que propõe um mecanismo explicando a relação variante/doença, vários trabalhos subsequentes não demonstram associação desse SNP com diversas doenças auto-imunes.

ANJOS *et al.* (2005), na tentativa de replicar os resultados encontrados por UEDA e colaboradores, não confirmaram tais resultados, sugerindo que a associação encontrada por aqueles autores com doenças auto-imunes deva ser reavaliada. Concluem, ainda, que o mecanismo pelo qual variantes do SNP CT60 encontram-se associadas a doenças auto-imunes ainda permanece a ser determinado, mas não provavelmente não se deve a modulação da quantidade de isoformas conhecidas do gene *CTLA4*.

Diante disso, os resultados encontrados nesta análise podem ser parcialmente explicados de duas formas:

- 1) Ao contrário do que propôs UEDA *et al.* (2003), CT60 não é a variante causal de susceptibilidade para essas doenças auto-imunes e sim, estaria em desequilíbrio de ligação com a verdadeira variante causal nas populações estudadas;
- 2) As associações encontradas com os genótipos A/G e G/G são verdadeiras e causais de forma que o próprio polimorfismo CT60 estaria influenciando o desenvolvimento da doença. Nesse contexto, a proteção/susceptibilidade conferida por esta posição variável para certas doenças auto-imunes pode ser diferente, em função do perfil genético e/ou dos fatores ambientais que influenciam as doenças genéticas complexas.

Sugere-se que análises com outros marcadores dentro dessa região genômica, análises de interação gênica e estudos com amostras estratificadas devam ser realizadas a fim de corroborar ou não o envolvimento do polimorfismo CT60 na susceptibilidade/resistência ao PF e a doenças auto-imunes de forma geral.

São descartadas hipóteses como de erro de genotipagem pelos motivos citados no tópico “Considerações sobre a qualidade da genotipagem”.

Foi possível a caracterização das frequências alélicas nos grupos estudados e comparação com resultados para outras populações relacionadas. Em um estudo de associação com esclerose múltipla, em uma amostra de indivíduos de origem predominantemente européia, TEUTSCH *et al.* (2004) encontraram as seguintes frequências para os alelos G e A, nos indivíduos-controle de sua amostra, respectivamente: 54% e 46%, o que está de acordo com os resultados obtidos no

presente trabalho, no qual as frequências dos alelos G e A são: 56,4% e 43,6%, para a amostra EU. A frequência do alelo A é um pouco inferior na amostra AF: 39,6%.

6.7 Considerações sobre as análises dos locos microssatélites *CTLA4 (TA)_n* e *D2S72*

Este estudo revelou associações entre PF e variantes dos locos microssatélites *CTLA4 (TA)_n* e *D2S72*. Uma associação positiva foi encontrada com o alelo *104 (OR= 1,91) do microssatélite *CTLA4 (TA)_n* na população EU. Não foi encontrada associação deste alelo com PFE na amostra afro-brasileira. Isso pode ter ocorrido devido à amostra afro-brasileira ser menor do que a amostra EU, principalmente quando considerado o número de indivíduos-controle analisados; ou pelo fato das frequências alélicas serem diferentes entre os dois grupos étnicos estudados. Outra possibilidade a ser considerada é a existência de um loco intimamente ligado ao microssatélite *CTLA4 (TA)_n*, cujo alelo de susceptibilidade encontra-se em desequilíbrio de ligação com o alelo *104 em europeus, mas não em africanos.

Quanto ao alelo *100 pode ser que a associação encontrada não seja verdadeira, em vista do tamanho amostral reduzido e à frequência relativamente baixa desse alelo. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de desequilíbrio de ligação deste alelo com o alelo de susceptibilidade em africanos.

A possibilidade de erro de genotipagem não pode ser descartada, uma vez que o padrão do pico característico para esse marcador é irregular. Isso torna a atribuição dos genótipos mais subjetiva, podendo ocorrer erros de interpretação dos dados. Por isso, os dados obtidos para esse loco devem ser novamente analisados e a amostra retipada e aumentada para verificar as associações e as frequências alélicas encontradas se mantêm.

Na análise de *D2S72*, foi encontrada associação entre o PF e variantes deste loco microssatélite, que é um marcador localizado entre os genes *CTLA4* e *ICOS*. Associações positivas foram encontradas na amostra total e na amostra de euro-brasileiros com o alelo *167. Apesar da diferença nas frequências de pacientes e controles na amostra AF não ser significativa estatisticamente, verifica-se um aumento da frequência do alelo 167 entre os pacientes nesse grupo populacional. Como o possível efeito do alelo é baixo, o pequeno tamanho da amostra AF dificulta a obtenção de resultados conclusivos. Entretanto, também foi encontrada associação positiva entre o genótipo 167/167 nos dois subgrupos analisados e na amostra total, sendo que associação altamente significativa foi encontrada na amostra total.

Foram estimadas as frequências haplotípicas desses dois marcadores com todas as outras posições analisadas neste trabalho (dados não mostrados). Foram encontradas associações positivas para os seguintes haplótipos:

- *D2S72*167_CTLA4*104* na amostra EU (OR= 1,99; IC= 1,17-3,41; *P*= 0,014);
- *CT60*G_D2S72*167* na amostra total (OR= 1,46; IC= 1,07-1,99; *P*= 0,016);
- *CT60*G_D2S72*167_CTLA4*104* na amostra total (OR= 1,99; IC= 1,17-3,41; *P*= 0,041);

Note-se que em todos esse haplótipos estão presentes alelos que na análise individual estão em associação positiva com PF, particularmente o alelo *D2S72*167*.

Uma associação com significância estatística próxima do limite estabelecido também foi encontrada com o haplótipo *CT60*G_CTLA4*104* na amostra total (OR= 1,9; IC= 1,05-3,91; *P*= 0,051) .

Diante de tais resultados, as associações encontradas com CT60 e CTLA4 (TA)n devem ser principalmente devidas ao fato dessas posições estarem em desequilíbrio de ligação com o alelo *D2S72*167*. E genes localizados próximos a este marcador devem exercer influência na patogênese do pênfigo foliáceo endêmico.

6.8 Considerações gerais

Doenças de etiologia complexa, ou multifatorial, são aquelas resultantes de uma interação entre múltiplos fatores exógenos e endógenos. Fazem parte desse grupo, as doenças auto-imunes, as psiquiátricas, as neurodegenerativas e doenças como diabetes, hipertensão e obesidade. Essas doenças são, sem dúvida, as principais causas de morbidade e mortalidade na sociedade atual (KING *et al.*, 1992).

As doenças auto-imunes afetam cerca de 5 a 7% da população, representando um dos principais problemas de saúde pública. O padrão de herança das doenças auto-imunes é complexo e, ao contrário das doenças mendelianas, para quais um gene mutado em dose simples ou dupla é considerado suficiente para a expressão da anomalia, a grande maioria das doenças comuns envolve o conceito de susceptibilidade genética (KING *et al.*, 1992).

A identificação de genes envolvidos em doenças complexas vem sendo intensificada atualmente (KIBERSTIS e ROBERTS, 2002), através da exploração das variações polimórficas do genoma humano. Os polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs), juntamente com os

microssatélites, vem sendo amplamente utilizados como marcadores (WILLET, 2002). No genoma humano, seqüências codificadoras de proteínas contêm cerca de aproximadamente 100 a 300 mil SNPs, os quais, juntamente com os muitos polimorfismos de DNA localizados em regiões reguladoras da expressão gênica, são informativos na busca de marcadores associados a doenças (CARGIL *et al.*, 1999).

Um dos grandes desafios nos estudos de associação é escolher genes candidatos e, dentro desses, posições variáveis que, de alguma forma, possam estar contribuindo para sua patogênese. O conhecimento da função do gene e da variação funcional decorrente da variabilidade deste, facilitam muito na escolha apropriada dos marcadores e na interpretação dos resultados nos estudos de associação com genes candidatos. A avaliação do significado funcional de variantes genéticas pode ser realizada através de diferentes abordagens. Essas incluem alterações funcionais e/ou estruturais que estas variantes podem causar, das taxas de conservação evolutiva, de freqüências em populações, além de abordagens experimentais e epidemiológicas. SNPs podem promover trocas de aminoácidos na proteína (mutações não sinônimas) ou afetar a expressão (se localizadas em sítios importantes para a regulação do gene), a especificidade tecidual, a função e o balanço da expressão de isoformas do gene.

Microssatélites também são amplamente empregados em estudos de associação. As funções exercidas por estes segmentos ainda não são bem conhecidas, mas diferentes alelos podem gerar diferenças na taxa de transcrição do gene onde o microssatélite se encontra (LOVEJOY *et al.*, 2003), ou na recomposição do RNA mensageiro (ARVANITIS *et al.*, 2003), sendo que alguns alelos podem contribuir diretamente para o desenvolvimento de certas doenças. Os marcadores microssatélites também podem ser usados para o mapeamento de genes responsáveis por doenças, através de métodos de análise de famílias (estudo de ligação e de associação) ou de populações (estudos de associação). Neste trabalho realizamos análise de associação pela comparação das freqüências alélicas, genotípicas e haplotípicas entre amostras de indivíduos saudáveis (controles) e pacientes (casos). Se for encontrada diferença estatística nessas comparações, entende-se que o marcador deve estar em desequilíbrio de ligação com um dos locos da doença, havendo ainda a possibilidade dele próprio ser um dos locos relevantes para a patogênese.

Além de se escolher bons marcadores para um estudo de associação, a consistência e reprodutibilidade das associações encontradas em diferentes estudos pode ser importante para a avaliação do significado funcional da variabilidade genética (REBBECK *et al.*, 2004). A análise

integrada de variáveis genéticas associadas a doenças, juntamente com os fatores exógenos pode levar a caracterização dos papéis de cada gene no desenvolvimento de doenças multifatoriais (WILLET, 2002).

Polimorfismos na região 2q33 foram relacionados com muitas doenças auto-imunes, tais como doença de Graves, tireoidite de Hashimoto, diabetes do tipo I, esclerose múltipla, asma, entre outras. A maioria dos estudos relaciona essas doenças com variação genética encontrada no gene *CTLA4*.

Alguns autores defendem que um mesmo conjunto de genes está contribuindo para o desenvolvimento de várias doenças auto-imunes. A coincidência de diferentes doenças auto-imunes em algumas famílias e indivíduos sugere que alguns genes predis põem indivíduos à auto-imunidade geral. Como já citado, além dos genes HLA, KRISTIANSEN *et al.* (2000) sugerem que o gene *CTLA4* integre esse grupo.

No presente trabalho foram analisados SNPs e locos microssatélites localizados nos genes *CD28* e *CTLA4* e um marcador intergênico entre os genes *CTLA4* e *ICOS*. Esses genes codificam moléculas expressas nas superfícies de células T, cuja ativação, inibição e interação são responsáveis por manter a homeostase imunológica. Foram analisadas 9 posições que vão desde a região promotora do gene *CD28* até a região 3' UTR do gene *CTLA4*, numa extensão de aproximadamente 215 Kb. Foi optado pela análise de SNPs que resultassem em alguma diferença funcional entre as variantes, ou que pudessem estar relacionados a doenças por estarem em desequilíbrio de ligação com a verdadeira posição de susceptibilidade, a julgar pelos resultados de estudos de outras doenças auto-imunes. Foram analisados SNPs cujas variantes estariam relacionadas com possíveis funções reguladoras, sítios de recomposição alternativa, trocas de aminoácidos em regiões codificadoras, alteração da taxa de transcrição e até um marcador intergênico para detecção de locos causais em desequilíbrio de ligação com esse.

Apesar de haver vários estudos de associação de SNPs do gene *CTLA4* com doenças auto-imunes, não há uma concordância geral com relação aos resultados. A ausência de associação entre a doença e as variantes de *CTLA4*, em alguns trabalhos, e a constatação de associação, em outros, pode acontecer porque:

- 1) O conjunto de genes que contribuem para o estabelecimento de diversas patologias não é o mesmo e *CTLA4* é importante em algumas doenças, mas não em outras;

- 2) O gene envolvido no desenvolvimento da doença está ligado ao *CTLA4* e, nas diversas populações estudadas, há diferentes graus de desequilíbrio de ligação entre variantes desse suposto gene e do gene *CTLA4*.

Outra questão com relação aos estudos de associação com SNPs do gene *CTLA4*, é que não há evidências conclusivas de que polimorfismos deste gene resultem em função ou expressão variável da molécula CTLA-4, muito menos de um mecanismo que explicasse a relação entre o SNP associado e a doença.

Em nosso estudo não foram encontradas associações positivas e/ou negativas com os SNPs analisados para o gene CD28, nem com o marcador CD28 (CAA)_n. Também não foram encontradas associações com os SNPs -1722, -1577 e +49 do gene *CTLA4*.

É interessante notar que as posições para as quais foram encontradas associações neste trabalho (CT60, CTLA4 (TA)_n e D2S72) estão localizadas numa região de maior desequilíbrio de ligação e a jusante do gene *CTLA4*. Cabe lembrar que a região 2q33 inclui três genes: *CD28*, *CTLA4* e *ICOS*, sendo que este último não analisado neste estudo. Diante de tais resultados e levando-se em conta a proximidade de *ICOS* e de *CTLA4*, é provável que a relação entre marcadores da região genômica 2q33 e doenças auto-imunes seja devida a variantes do gene *ICOS* ou genes até mais distantes como *PDCD1*, localizado na região 2q37, e não às variantes localizadas nos genes *CD28* e *CTLA4* (LING *et al.*, 2001).

ICOS codifica uma proteína de mesmo nome que também atua uma molécula co-estimuladora, mas por não apresentar o mesmo sítio conservado MYPPPY que as moléculas CD28 e CTLA-4, não compartilha os mesmos ligantes CD80 e CD86. Ao interagir com o seu ligante ICOS-L participa de uma outra via de sinalização para ativação, diferenciação e proliferação de células B, proliferação de células T e produção de citocinas do tipo Th2. Estimulação crônica através de ICOS e seu ligante em camundongos transgênicos revelou um fenótipo consistente com hiperestimulação de células B. Doença de Graves e diabetes do tipo I compartilham uma disfunção imunológica na qual são gerados auto-anticorpos, sugerindo uma desregulação da diferenciação de células B e produção de anticorpos. O mesmo ocorre em outras doenças auto-imunes, como o PFE.

MARRON *et al.* (2000) fizeram um mapeamento físico e genético para a susceptibilidade a diabetes do tipo I e encontraram um alto grau de desequilíbrio de ligação entre o início da diabetes do tipo 1 e a região genômica que incluía os marcadores D2S72, o gene *CTLA4* e o

marcador D2S105. Esta região foi denominada loco gênico IDDM12. Entretanto, COLLINS *et al.* (2001) apresentaram resultados discrepantes com relação aos comentados acima, mostrando que o desequilíbrio de ligação encontrado entre diabetes do tipo I e a região 2q33 é modulada à jusante do gene *CTLA4*, indo em direção ao gene *ICOS*. Esses resultados abrem a possibilidade para que regiões próximas a *ICOS*, incluindo este, sejam as correspondentes ao loco IDDM12.

Diante do exposto acima e dos resultados deste trabalho, sugere-se que a não concordância de associações encontradas para polimorfismos do gene *CTLA4* seja devida, principalmente, ao fato de que este não seja um dos genes diretamente envolvidos no desenvolvimento das doenças auto-imunes e sim, que se encontra muito próximo e em desequilíbrio de ligação com o verdadeiro gene de predisposição a estas doenças.

Sugere-se então que sejam feitas análises mais detalhadas e envolvendo maior número de polimorfismos, incluindo posições variáveis de genes próximos a *CTLA4*, como os genes *ICOS* e *PDCD1*, que permitirão uma identificação mais precisa dos elementos genômicos que contribuem para a predisposição a doenças auto-imunes associadas com a região 2q33.

Lembramos que os resultados deste estudo não excluem o envolvimento das moléculas CD28 e CTLA-4 no desenvolvimento e patogênese da doença, somente indicam que a sua diversidade genética não exerce impacto sobre a susceptibilidade à mesma.

7 CONCLUSÕES

- As variantes analisadas do gene *CD28* e os haplótipos constituídos por esses polimorfismos não estão associados à doença pênfigo foliáceo endêmico.
- O estado de portador do alelo A para o SNP CT60, na amostra total (OR= 0,61), o genótipo A/G (OR= 0,58) e o genótipo G/G (OR = 1,64) estão associados ao pênfigo foliáceo endêmico.
- Os SNPs -1722, -1577 e +49 do gene *CTLA4* e haplótipos constituídos por esses polimorfismos não estão associados ao pênfigo foliáceo endêmico.
- O alelo *104 do microssatélite CTLA4 (TA)_n (OR = 1,91) na amostra EU, como também para o estado de portador deste alelo (OR = 2,11) no mesmo subgrupo amostral.
- O alelo *167 do marcador está associado positivamente à doença na amostra EU e na amostra total (OR= 1,45 e 1,48 respectivamente). Associação positiva com o genótipo 167/167 foi encontrada nos grupos EU, AF e amostra total (OR = 2,30 para a amostra EU; 2,04 para a amostra AF e 2,70 para a amostra total). Associações positivas também foram encontradas com os seguintes haplótipos *D2S72*167_CTLA4*104* na amostra EU (OR= 1,99), *CT60*G_D2S72*167* na amostra total (OR = 1,46) e *CT60*G_D2S72*167_CTLA4*104* na amostra total (OR = 1,99).
- Provavelmente as associações encontradas para o SNP CT60 e o loco microssatélite CTLA4 (TA)_n se devem principalmente ao fato dessas posições estarem em desequilíbrio de ligação com o marcador D2S72. Supõe-se que genes localizados próximos a este marcador devem exercer influência na patogênese do pênfigo foliáceo endêmico. Além disso, provavelmente as associações verificadas se devem a genes localizados a jusante do gene *CTLA4*, uma vez que não foram encontradas associações positivas e/ou negativas para as demais posições analisadas de *CTLA4* e *CD28*, nem individualmente, nem em combinações haplotípicas.

- As frequências alélicas dos marcadores analisados neste trabalho foram: CD28 -372*A 34,7% e 34,3%; CD28INT3*T 80,0% e 86,2%; CD28 (CAA)n*156 81,2% e 82,2%¹; CTLA4-1722*T 93,0% e 94,7%; CTLA4-1577*G 60,8%; 64,5%; CTLA4+49*A 66,2% e 63,0%; CT60*G 44,0% e 39,0%, CTLA4 (TA)n*86 49,0% e 36,1% e D2S72*167 35,9% e 43,1%, em EU e AF, respectivamente.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS AK, LICHTMAN AH, POBER JS. **Imunologia Celular e Molecular**; V. R. S. 2ª edição. Rio de Janeiro, Editora Revinter, 1997, p.497.
- ABBAS AK, LOHR J, KNOECHEL B, NAGABHUSHANAM V. T cell tolerance and autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**; 3:471-475, 2004.
- AGARWAL K, JONES DE, DALY AK, JAMES OF, VAIDYA B, PEARCE S, BASSENDINE MF. CTLA-4 gene polymorphism confers susceptibility to primary biliary cirrhosis. **Journal of Hepatology**; 32 :538-541, 2000.
- AGUILAR F, TORRES B, SÁNCHEZ-RÓMAN J, NÚÑEZ-ROLDÁN A, GONZÁLEZ-ESCRIBANO M.F. CTLA4 polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. **Human Immunology**; 64: 936-940, 2003.
- AHMED S, HARA K, KANEMITSU S, NAKASHIMA T, OTSUKA K, TAKEUCHI T, HARA T. Association of CTLA-4 but not CD28 polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. **Rheumatology**; 40: 662-667, 2001.
- AMUNDSEN SS, NALUAI AT, ASCHER H, EK J, GUDJÓNSDÓTTIR AH, WAHLSTRÖM J, LIE BA, SOLLID LM. Genetic analysis of the CD28/CTLA4/ICOS (CELIAC 3) region in celiac disease. **Tissue Antigens**; 64: 593-599, 2004.
- ANHALT GJ. Making sense of antigens and antibodies in pemphigus. **Journal American Academy of Dermatology**; 40: 763-766, 1999.
- ANJOS SM, NGUYEN A, OUNISSI-BENKALHA H, TESSIER MC, POLYCHRONAKOS, C. A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. **Journal of Biological Chemistry**; 277: 46478-46486, 2002.

- ANJOS SM, SHAO W, MARCHAND L, POLYCHRONAKOS C. Allelic effects on gene regulation at the autoimmunity-predisposing CTLA4 locus: a re-evaluation of the 3' +6320 G>A polymorphism. **Genes and Immunity**; 4: 305-311.
- APPLEMAN LJ, BEREZOVSKAYA A, GRASS I, BOUSSIOTIS VA. Cd28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. **Journal of Immunology**; 164:144-151, 2000.
- ARNOLD B, LIMMER A, TAFURI A, HÄMMERLING GJ. **HLA and diseases -the molecular basis**. Copenhagen: Munksgaard, 1997.
- ARVANTIS DA, KOUMANTAKIS GE, GOUMENOU AG, MATALLIOTAKIS IM, KOUMANTAKIS EE, SPANDIDOS DA. CYP1A1, CYP19 and CSTM1. Polymorphisms increase the risk of endometriosis. **Fertility and Sterility**; 79: 702-709, 2003.
- ATABANI SF, THIO CL, DIVANOVIC S, TROMPETTE A, BELKAID Y, THOMAS DL, KARP, CL. Association of CLTA4 polymorphism with regulatory T cell frequency. **European Journal of Immunology**; 35:1-5, 2005.
- BACHMANN MF, SEBZDA E, KUNDIG TM, SHAHINIAN A, SPEISER DE, MAK TW, OHASHI PS. T cell responses are governed by avidity and co-stimulatory thresholds. **European Journal of Immunology**; 26:2017-2022.
- BAROJA ML, LUXENBERG D, CHAU T, LING V, STRATHDEE CA, CARRENO BM, MADRENAS J. The inhibitory function of CTLA-4 does not require tyrosine phosphorylation. **Journal of Immunology**; 164:49-55, 2000.
- BARRETO M, SANTOS E, FERREIRA R, FESEL C, FONTES MF, PEREIRA C, MARTINS B, ANDREIA R, VIANA JF, CRESPO F, VASCONCELOS C, FERREIRA C, VICENTE AM. Evidence for CTLA-4 as a susceptibility gene for systemic lupus erythematosus. **European Journal of Human Genetics**; 12:620-626, 2004.

- BECKER KG, SIMON R.M, BAILEY-WILSON JE. Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; 95:9979-9984, 1996.
- BRUNET J.F, DENIZOT F, LUCIANI M, ROUX-DOSSETO M, SUSAN M, MATTEI, M, GOLSTEIN P. A new member of the immunoglobulin superfamily – CTLA-4. **Nature**; 328: 267-270, 1987.
- BOISE LH, MINN AJ, NOEL PJ, JUNE CH, ACCAVITTI MA, LINDSTEN T, THOMPSON CB. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-xl. **Immunity**; 3:87-98.
- CAMPBELL R, AIOK V, CUNHA P, HANS FILHO G, ALVES G, ROCHA R, FRIEDMAN H. Endemic pemphigus foliaceus/fogo selvagem. **Anais Brasileiros de Dermatologia** ; 76:13-33, 2001.
- CARGIL M, ALTSHULER D, IRELAND J, SKLAR P, ARDLIE K, PATIL N, SHAW N, LANE CR, LIM EP, KALYANARAMAN N, NEMESH J, ZIAUGRA L, FRIEDLAND L, ROLFE A, WARRINGTON J, LIPSHUTZ R, DALEY GQ, LANDER ES. Characterization of the single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. **Nature Genetics**; 22(3): 231-238, 1999.
- CERNA M, FERNANDEZ-VIÑA M, FRIEDMAN H, MORAES J R, MORAES ME, DIAZ L, STASTNY P. Genetic markers for susceptibility to endemic Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in Xavante indians. **Tissue Antigens**; 42:138-140, 1993.
- CHIDGEY MAJ. Desmosomes and disease. **Histology and Histopatology**; 12:1159-1168, 1997.
- CHUANG E, ALEGRE ML, DUCKETT CS, NOEL PJ, VANDER HEIDEN MG, THOMPSON CB. Interaction of CTLA-4 with the clathrin-associated protein AP50 results in ligand-independent endocytosis that limits cell surface expression. **Journal of Immunology**; 159:144-151, 1997.

- COLLINS AV, BRODIE DW, GILBERT RJ, IABONI A, MANSO-SANCHO R, WALSE B, STUART DI, VAN DER MERWE PA, DAVIS SJ. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. **Immunity**; 17:201, 2002.
- CONNE B, STUTZ A, VASSALI JD. The 3' untranslated region of messenger RNA: a molecular "hotspot" for pathology? **Nature Medicine**; 6:637-641, 2000.
- DARIAVACH P, MATTEI M, GOLDSTEIN P, LEFRANC M. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmatic domains. **European Journal of Immunology**; 18:1901-1905, 1995.
- DEICHMANN K, HEINZMANN A, BRÜGGENOLTE E, FORSTER J, KUEHR J. Na *Mse* I RFLP in the human CTLA-4 promotor. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v.225, p.817-818, 1996.
- DJILALI-SAIAH I, SCHMITZ J, HARFOUCH-HAMMOUD E, MOUGENOT JF, BACH, JF, CAILLAT-ZUCMAN S. CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to celiac disease. **Gut**; 43:187-189, 1998.
- DJILALI-SAIAH I, OUELLETTE P, CAILLAT-ZUCMAN S, DEBRAY D, KOHN JI, ALVAREZ F. CTLA-4/CD28 region polymorphisms in children from families with autoimmune hepatitis. **Human Immunology**; 62:1356-1362, 2001.
- DONNER H, BRAUN J, SEIDL C, RAU H, FINKE R, VENTZ M, WALFISH PG, USADEL KH, BADENHOOP K. Codon 17 polymorphisms of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene in Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**; 82:4130-4132, 1997.
- FERREIRA DM. **Pênfigo foliáceo endêmico e polimorfismo genético da desmogleína 1: existe alguma relação?** Curitiba, 2003. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná.

- FRASER JD, IRVING BA, CRABTREE GR, WEISS A. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. **Science**; 251:313-316.
- GOUGH SCL, WALKER LSK, SANSOM DM. CTLA4 gene polymorphisms and a autoimmunity. **Immunological Reviews**; 204:102-115, 2005.
- GREENWALD RJ, BOUSSIOTIS VA, LORSBACH RB, ABBAS AK, SHARPE AH. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. **Immunity**; 14:145-155, 2001.
- GROHMANN U, ORABONA C, FALLARINO F, VACCA C, CALCINARO F, FALORNI A, CANDELORE P, BELLADONNA ML, BIANCHI R, FIORETTI MC, PUCCETTI P. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. **Nature Immunology**; 3:1097-1101, 2002.
- GUO S, THOMPSON E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**; 48:361-372, 1992.
- GUZMAN VB, MORGUN A, SHULZHENKO N, MINE KL, GONÇALVES-PINTO A, MUSATTI CC, GERBASE-DELIMA M. Characterization of CD28, CTLA4 and ICOS polymorphisms um three brazilian ethnic groups. **Human Immunology**; 66 (7):773-776, 2005.
- HANS-FILHO G, AOKI V, RIVITTI E, EATON DP; LIN MS, DIAZ L. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem)-1998. **Clinics in Dermatology**; 17:225-235, 1999.
- HARLAN DM, ABE R, LEE KP, JUNE CH. Potencial roles of the B7 and CD28 receptor families in autoimmunity and immune evasion. **Clinical Immunology and Immunopathology**; 75:99-111, 1995.
- HARPER K, BALZANO C, ROUVIER E, MATTEI M, LUCIANI M, GOLSTEIN P. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in the both mouse and human as

to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. **Journal of Immunology**; 147:1037-1044, 1991.

HOLOPAINEN P, NAULAI AT, MOODIE S, PERCOPO S, COTO I, CLOT F, ASCHER H, SOLLID L, CICLITIRA P, GRECO L, CLERGET-DARPOUX F, PARTANEN J. Candidate gene region 2q33 in European families with coeliac disease. **Tissue Antigens**; 63:212-222, 2004.

HUDSON LL, ROCCA K, SONG YW, PANDEY JP. CTLA-4 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a highly significant association with a determinant in the promoter region. **Human Genetics**; 111:452-455, 2000.

IHARA K, AHMED S, NAKAO F, KINUKAWA N, KUROMARU R, MATSUURA N, IWATA, I, NAGAFUCHI S, KOHNO H, MIYAKO K, HARA, T. Association studies of *CTLA-4*, *CD28* and *ICOS* gene polymorphisms with type 1 diabetes in the Japanese population. **Immunogenetics**; 53:447-454, 2001.

IKEMIZU S, GILBERT RJ, FENNELLY JA, COLLINS AV, HARLOS K, JONES EY, STUART DI, DAVIS SJ. Structure and dimerization of a soluble form of B7-1. **Immunity**; 12:51-60, 2000.

JANEWAY CA, TRAVERS P. **Imunobiologia: O sistema imunológico na saúde e na doença**. 2º edição, Porto Alegre, Artes Médicas, 1997.

JUNE CG, BLUESTONE JÁ, NADLER LM, THOMPSON CB. The B7 and CD28 receptor families. **Immunology Today**; 15:321-331, 1994.

KIBERSTIS P, ROBERTS L. It's not just the genes. **Science**; 296: 685, 2002.

KING RA, ROTTER JI, MOTULSKY AG. The approach to genetic bases of common diseases. In *The Genetic Basis of common diseases*. **Oxford University Press**, new York, 1992.

- KOTSA PJ, WATSON PF, WEETMAN AP. A CTLA4 gene polymorphism is associated with both Grave's disease and autoimmune hypothyroidism. **Clinics of Endocrinology**; 46:551-554, 1997.
- KRISTIANSEN P, LARSEN Z.M, POCIOT F. CTLA-4 in autoimmune diseases – a general susceptibility gene to autoimmunity? **Genes and Immunity**; 1:170-184, 2000.
- LAHIRI DK, NURNBERGER JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of DNA from blood for FLRP studies. **Nucleic Acids Research**; 19:5444, 1991.
- LEE CS, LEE YJ, LIU HF, SU CH, CHANG SC, WANG BR, CHEN TL, LIU TL. Association of the CTLA4 gene A-G polymorphism with rheumatoid arthritis in the Chinese. **Clinical Rheumatology**; 22:221-224, 2003.
- LEE KP, TAYLOR C, PETRYNIAK B, TURKA LA, JUNE CH, THOMPSON CB. The genomic organization of the CD28 gene. Implications for the regulation of CD28 mRNA expression and heterogeneity. **The Journal of Immunology**; 145:344-352, 1990.
- LI N, AOKI V, HANS-FILHO G, RIVITTI EA, DIAZ LA. The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **The Journal of Experimental Medicine**; 197:1501-1510, 2003.
- LINDSTEIN T, JUNE CH, LEDBETTER JA, STELLA G, THOMPSON CB. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. **Science**; 244:339-343.
- LINDSTEN T, LEE KP, HARRIS ES, PETRYNIAK B, CRAIGHEAD N, REYNOLDS PJ, LOMBARD DB, FREEMAN GJ, NADLER LM, GRAY GS. Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. **Journal of Immunology**; 151:3489-3499, 1993.

- LING V, WU PW, FINNERTY HF, SHARPE AH, GRAY GS, COLLINS M. Complete sequence determination of the mouse and human CTLA4 gene loci: cross-species DNA sequence similarity beyond exon borders. **Genomics**; 60:341-355, 1999.
- LING V, WU PW, FINNERTY HF, AGOSTINO MJ, GRAHAM JR, CHEN S, JUSSIFF JM, FISK GJ, MILLER CP, COLLINS M. Assembly and annotation of human chromosome 2q33 sequence containing the CD28, CTLA4, and ICOS gene cluster: Analysis by computational, comparative and microarray approaches. **Genomics**; 78:155-168, 2001.
- LINSLEY PS, BARDY W, URNES, M.; GROSMARE, L.S.; DAMLE, N.K.; LEDBETTER, J.A. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. **Journal of Experimental Medicine**; 174, p.561-569, 1991.
- LINSLEY PS, GREENE JL, TAN P, BRADSHAW J, LEDBETTER J.A, ANASETTI C, DAMLE NK. Coexpression and functional cooperativity of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. **Journal of Experimental Medicine**; 176:1595-1904, 1992.
- LOISEAU P, LECLEACH L, PROST C, LEPAGE V, BUSSON M, BASTUJI-GARIN S, ROUJEAU JD, CHARRON D. HLA class II polymorphisms contribute to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and foliaceus. **Journal of Autoimmunity**; 15:67-73, 2000.
- LOMBARDI C, BORGES PC, CHAUL A, SAMPAIO SP, RIVITTI EA., FRIEDMAN H, MARTINS CR, SANCHES JA, CUNHA P, HOFFMANN RG, DIAZ LA. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **The Journal of Investigative Dermatology**; 98: 847-850, 1992.
- LOVEJOY EA, SCOTT AC, FISKESTRAND CE, BUBB VJ, QUINN JP. The serotonin transporter intronic VNTR enhancer correlated with a predisposition to affective disorders has distinct regulatory elements within the domain based on the primary DNA sequence of the repeat unit. **European Journal of Neuroscience**; 17: 417-420, 2003.

- McADAM AJ, SCHWEITZER NA, SHARPE AH. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4- and CD8+ T cells. **Immunology Reviews**; 165:231-247, 1998.
- MANZOTTI CN, TIPPING H, PERRY LC., MEAD KL, BLAIR PJ., ZHENG Y, SANSOM DM. Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25+ regulatory T cells. **European Journal of Immunology**; 32:2888-2896, 2002.
- MARTIN M, SCHNEIDER H, AZOUZ A, RUDD CE. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function. **Journal of Experimental Medicine**; 194:1675-1681, 2001.
- MATSUSHITA M, TSUCHIYA N, OKA T, TOKUNAGA K. New polymorphisms of human CD80 and CD86: lack of association with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Genes and Immunity**; 7: 428-434, 2000.
- MARRON MP, RAFFEL LJ, GARCHON H, JACOB CO, SERRANO-RIOS M, LARRAD MTM, TENG W, PARK Y, ZHANG Z, GOLDSTEIN R, TAO Y, BEAURAIN G, BACH J, HUANG H, LUO D, ZEIDLER A, ROTTER JI, YANG MCK, MODILEVZKY T, MACLAREN NK, SHE, J. Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with *CTLA4* polymorphisms in multiple ethnic groups. **Human Molecular Genetics**; 8: 1275-1282, 1997.
- MARRON MP, ZEIDLER A, RAFFEL LJ, ECKENRODE SE, YANG JJ, HOPKINS DI, GARCHON HJ, JACOB CO, SERRANO-RIOS M, MARTINEZ LARRAD MT, PARK Y, BACH JF, ROTTER JI, YANG MC, SHE JX. Genetic and physical mapping of a type 1 diabetes susceptibility gene (IDDM12) to a 100-kb phagemid artificial chromosome clone containing D2S72-CTLA4-D2S105 on chromosome 2q33. **Diabetes**; 49: 492-499.
- MARTEL P, GILBERT D, BUSSON M. Epistasis between DSG1 and HLA class II genes in pemphigus foliaceus. **Genes and Immunity**; 3: 205-210, 2002.

- MAURER M, PONATH A, KRUSE N, RIECKMANN P. CTLA4 exon 1 dimorphism is associated with primary progressive multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**; 131: 213-215, 2002.
- MIYAGAWA S, AMAGAI M, NIIZEKI H, YAMASHINA Y, KANESHIGE T, NISHIKAWA T, SHIRAI T, INOKO H. HLA-DRB1 polymorphisms and autoimmune responses to desmogleins in Japanese patients with pemphigus. **Tissue Antigens**; 54: 333-340, 1999.
- MORAES JR, MORAES ME, FERNANDEZ-VIÑA M, DIAZ LA, FRIEDMAN H, CAMPBELL IT, ALVAREZ RR, SAMPAIO SA. P, RIVITTI E, STASTNY P. HLA antigens and risk for development of pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in endemic areas of Brazil. **Immunogenetics**; 33: 338-391, 1991.
- MORAES ME, FERNANDEZ-VIÑA M, LAZARO A, DIAZ LA, FILHO GH, FRIEDMAN H, RIVITTI E, AOKI V, STASTNY P, MORAES JR. An epitope in the third hypervariable region of the DRB1 gene is involved in the susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in three different Brazilian populations. **Tissue Antigens**; 49: 35-40, 1997.
- MILLER MP. **RxC: a program for the analysis of contingency tables via the metropolis algorithm computer**. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, 1997.
- MILLER JFPA, KURTS C, ALLISON J, KOSAKA H, CARBONE F, HEATH WR. Induction of peripheral CD8+ T-cell tolerance by cross-presentation of self antigens. **Immunology Reviews**; 165: 267-277, 1998.
- NITHIYANANTHAN R, HEWARD JM, ALLAHABADIA A FRANKLYN JÁ, GOUGH SC. Polymorphism of the CTLA4 gene is associated with autoimmune hypothyroidism in the United Kingdom. **Thyroid**; 12: 3-6, 2002.
- OMIM. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

- OOSTERWEGEL MA, MANDELBROT DA, BOYD SD, LORSBACH RB, JARRETT DY, ABBAS AK, SHARPE AH. The role of CTLA-4 in regulation Th2 differentiation. **Journal of Immunology**; 163: 2634-2639, 1999.
- PARHAM P. Imunidade Mediada por Célula T. In: **O Sistema Imune**. Tradução Bolner, A. R. 1ª edição. Porto Alegre, Artmed Editora, 2001, p. 135-142.
- PAVONI DP, ROXO VS, MARQUART FILHO A, PETZL-ERLER ML. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. Dominant protection, dose-dependent susceptibility. **Genes and Immunity**; 4: 110-116, 2003.
- PAVONI DP, CERQUEIRA LB, ROXO VMMS, PETZL-ERLER ML. Promoter region and exon 1 polymorphisms of the CTLA4 gene in Endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo selvagem). **Submetido**, 2005.
- PENTCHEVA-HOANG T, EGEN JG, WOJNOONSKI K, ALLISON JP. B7-1 e B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. **Immunity**; 21:401-413, 2004.
- PEREIRA NF, HANSEN JA, LIN MT, ROXO VM, BRAUN K, PETZL-ERLER ML. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants. **Cytokine** 21; 28(6): 233-241, 2004.
- PETZL-ERLER ML, SANTAMARIA J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue Antigens**; 33: 408-414, 1989.
- PETZL-ERLER ML. Genetics of the immune responses and disease susceptibility. **Ciência e Cultura. Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**; 51: 199-211, 1999.

PROBST C.M. **CONVERT: uma ferramenta computacional auxiliar no estudo de polimorfismos genéticos, versão 1.1.** Laboratório de Genética Molecular Humana, Departamento de genética, Universidade Federal do Paraná, 1998.

RISCH N, MERIKANGAS K. The future of genetics studies of complex human diseases. **Science**; 273: 1516-1517, 1996.

RIOUX JD, ABBAS AK. Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. **Nature**, 435:584-589, 2005.

ROSE NR. Autoimmune disease 2002: An overview. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**; 9:

SAKAGUCHI S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune response. **Annual Reviews Immunology**; 22:531-562, 2004.

SAMBROOK RF, FRITSCH EF, MANIATIS T. **Molecular cloning – a laboratory manual.** 2^o ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, 1989.

SANSOM DM. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what e to whom? **Immunology**; 101:169-177, 2000.

SCHNEIDER P, ROESSLI D, EXCOFIER L. **ARLEQUIN: a software for population genetic data analisis, version 2000.** Genetics and Biometry Laboratories, Department of Antropology, University of Genève, Genève, 2000.

SHARPE AH, FREEMAN GJ. The B7-CD28 superfamily. **Nature immunology**; 2:116-126, 2002.

SHAW G, KAMEN R. A conserved AU sequence from the 3' untranslate region mediates selective mRNA degradation. **Cell**; 46:659-667, 1986.

- SHEVACH EM. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. **Nature Reviews Immunology**; 2:389-400, 2002.
- SINHA A, LOPEZ MT, McDEVITT HO. Autoimmune diseases: failure of self tolerance. **Science**; 248:1380-1387, 1997.
- SPERLING AI, AUGER JA, EHST BD, RULIFSON IC, THOMPSON CB, BLUESTONE JA. CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation. **Journal of Immunology**; 157:3909-3917, 1996.
- STRACHAN T, READ AP. **Genética Molecular Humana**. 2ed. São Paulo: Artmed Editira, 2002.
- SVEJGAARD A, JERSILD C, STAUB-NIELSEN L, BODMER WF. HLA antigens and disease – statistical and genetical considerations. **Tissue Antigens**; 4:95-105, 1974.
- SVEJGAARD A, RYDER LP. HLA and diseases association: detecting the strongest association. **Tissue Antigens**; 43: 18-27, 1994.
- TANG Q, BODEN EK, HENRIKSEN KJ, BOUR-JORDAN H, BI M, BLUESTONE JA. Distinct roles of CTLA-4 and TGF beta in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell function. **European Journal of Immunology**; 34:2996-3005, 2004.
- TEUTSCH SM, BOOTH DR, BENNETTS BH, HEARD RNS, STEWART GJ. Association of common T cell activation gene polymorphisms with multiple sclerosis in Australian patients. **Journal of Neuroimmunology**; 148:218-230, 2004.
- THIMOTHY CF, WU Y, KIPPS TJ. Identification of a promoter element that regulates tissue-specific expression of the human *CD80 (B7.1)* gene. **The Journal of Immunology**; 157:4442-4450, 1996.

TIVOL EA, SCHWEITZER N, SHARPE AH. Costimulation and autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**; 8:822-830, 1996.

TODD JA. From genome to etiology in a multifactorial disease, type 1 diabetes. **BioEssays**; 67:164-174, 1999.

UEDA H, HOWSON J.M, ESPOSITO L, HEWARD J, SNOOK H, CHAMBERLAIN G, RAINBOW DB, HUNTER K.M, SMITH AN, DI GENOVA G, HERR MH, DAHLMAN I, PAYNE F, SMYTH D, LOWE C, TWELLS RC, HOWLETT S, HEALY B, NUTLAND S, RANCE HE, EVERETT V, SMINK LJ, LAM AC, CORDELL HJ, WALKER NM, BORDIN C, HULME J, MOTZO C, CUCCA F, HESS JF, METZKER ML, ROGERS J, GREGORY S, ALLAHABADIA A, NITHIYANANTHAN R, TUOMILEHTO-WOLF E, TUOMILEHTO J, BINGLEY P, GILLESPIE KM, UNDLIEN DE, RONNINGEN KS, GUJA C, IONESCU-TIRGOVISTE C, MAXWELL AP, CARSON D.J, PATTERSON CC, FRANKLYN JA, CLAYTON DG, PETERSON LB, WICKER LS, TODD JA, GOUGH SC. Association of the T-cell regulatory gene CTLA-4 with susceptibility to autoimmune disease. **Nature**; 423:506-511, 2003.

VAIDYA B, IMRIE H, GEATCH DR, PERROS P, BALL SG, BAYLIS PH, CARR D, HUREL SJ, JAMES RA, KELLY WF, KEMP EH, YOUNG ET, WEETMAN AP, KENDALL-TAYLOR P, PEARCE SH. An association between the CTLA4 exon1 polymorphism and early rheumatoid arthritis with autoimmune endocrinopathies. **Rheumatology**; 41:180-183, 2002.

VEEN TV, CRUSIUS BA, WINSEN LV, XIA B, BARKHOF F. PENÃ AS. POLMAN C.H, UITDEHAAG B.M.J. CTLA-4 and CD28 gene polymorphisms in susceptibility, clinical course and progression of multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**; 40:188-193, 2003.

WILKER LS, ABBAS AK. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. **Nature Reviews Immunology**; 2:11-19, 2002.

WALUNAS TL, LENSCHOW DJ, BAKKER CY, LINSLEY PS, FREEMAN GJ, GREEN JM, THOMPSON CB, BLUESTONE JA. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. **Immunity**; 1:405-413, 1994.

WARREN SJP, LIN MS, GIUDICE GJ, HOFFMANN RG, HANS-FILHO G, AOKI V, RIVITTI EA, SANTOS V, DIAZ LA. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. **The New England Journal of Medicine**; 343:23-33, 2000.

WILLETT WC. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. **Science**; 296:695-698, 2002.

WOOLF B. On estimating the relation between blood group and disease. **Annual Human Genetics**; 19:251-253, 1955.

WOOD JP, PANI MA, BIEDA K, MEYER G, USADEL KH, BADENHOOP K. A recent described polymorphism in the CD28 gene on chromosome 2q33 is not association with susceptibility to type 1 diabetes. **European Journal of Immunogenetics**; 29:347-349, 2002.

YANAGAWA T, HIDAKA Y, GUIMARAES,V, SOLIMAN M, DEGROOT LJ. CTLA4 gene polymorphism associated with Grave's disease in Caucasian population. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**; 80:41-45, 1995.